ERATA

1) pag. 400; al. 2 de bas en haut, ligne 3 lire: 3,5 avec l'acide trichloracétique est redissous à pH 8,6, au lieu de: 3,5 avec l'acide trichloracétique à pH 8,6.
2) pag. 405; al. 3, ligne 6 lire: situés dans au lieu de: situés sans
3) pag. 405; titre, ligne 2 lire: neurotoxine au lieu de: neurotoyine
4) pag. 412; photographies 10 et 11, ligne 12 lire: Tyrosine au lieu de: Pyrosine.
5) pag. 420; al. 3, ligne 9 lire: le lipopolysaccharide au lieu de: le dilipopolysaccharide.
6) pag. 423; al. 2, de haut en bas, ligne 2 lire: b. Gärtner au lieu de: Sh. Gärtner.
7) pag. 431; al. 1, ligne 5 lire: cytotoxique au lieu de: oytotoxique
8) pag. 442; al. 1, ligne 8 lire: 0,30 g/m^2 au lieu de: 10,30 g/m^2
9) pag. 461; al. 3, ligne 2 lire: $H_{37}Rv$, $H_{37}Ra$ au lieu de: $H_{37}Rhv$, $H_{37}Rv$.
10) pag. 467; al. 8, ligne 3 lire: 29,7% au lieu de: 39,7%.
11) pag. 467; bibliographie point 1 lire: 1960, 19, 584 au lieu de: 1960, 19, IV.
12) pag. 513; photographies, avant derniere ligne lire: 3 — Témoin: acide α — amino-butyrique au lieu de: 3 — Témoin: acide γ — amino-butyrique.

ARCHIVES ROUMAINES
DE PATHOLOGIE EXPÉRIMENTALE
ET DE MICROBIOLOGIE

TOME 20 *No. 4* *DÉCEMBRE 1961*

IMMUNISATION ANTITÉTANIQUE DU NOUVEAU-NÉ PAR LA VACCINATION PENDANT LA GROSSESSE.

ÉTUDES CLINIQUES ET EXPÉRIMENTALES

par

P. Condrea, Elena Poenaru, Mira Esrig
et I. Filipesco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Laboratoire du Sérum Antitétanique)

— Manuscrit reçu le 2o septembre 1961 —

Malgré tous les progrès récents de la thérapeutique, le tétanos continue à rester une infection grave, avec une létalité des plus élevées; dans une des formes de cette maladie, — le tétanos des nouveau-nés, — les taux de la mortalité atteignent parfois (dans certaines statistiques) une proportion de 100%.

Il va de soi, qu'une assistance médicale organisée et l'éducation sanitaire des mères sont des facteurs décisifs dans la lutte contre l'éradication du tétanos d'origine ombilicale; il faut néanmoins remarquer que l'hospitalisation de toutes les parturientes ne résout pas complètement le problème, attendu que l'infection peut survenir aussi chez des enfants nés à l'hôpital, après avoir regagné leur domicile (1).

Les connaissances existantes quant à la transmission transplacentaire des anticorps de la mère au foetus pendant la gestation, ont suggéré un nouveau moyen de prévenir le tétanos du nouveau-né: l'immunisation active des femmes enceintes par l'anatoxine afin d'atteindre un niveau protecteur d'antitoxine tétanique dans le sang de l'enfant, au moment de sa naissance.

De nombreuses observations et recherches expérimentales ont prouvé que chez les mammifères l'immunité envers les différentes maladies infectieuses se transmet par voie passive de la mère à l'enfant. Ainsi, les agneaux nés de brebis récemment vaccinées étaient immuns à la vaccine; de même à l'anthrax, si les brebis gestantes avaient reçu auparavant un vaccin anti-charbonneux (5). Ehrlich a montré que l'immunité vis-à-vis de différentes toxines, y compris la toxine tétanique, est transmise de la souris aux souriceaux, tant par le colostrum, que par voie transplacentaire (13). D'autre part, il est connu que l'immunité spontanée envers certaines maladies (rougeole, diphtérie, scarlatine, poliomyélite),

observés chez l'homme au cours des premiers 6 mois d'existence, est conférée à l'enfant par les anticorps maternels.

Il faut souligner toutefois que, chez la plupart des mammifères à placenta complexe formé par plusieurs couches tissulaires interposées entre la circulation de la mère et celle du foetus, la transmission des anticorps de la femelle au nouveau-né à travers le placenta se fait en mesure réduite, la majorité des anticorps étant transmis par le colostrum. Par contre, chez l'homme, de même que chez les autres mammifères à placenta hémochorial (rongeurs et primates), chez lesquels les villosités choriales sont en contact direct avec le sang maternel, l'immunité passive du nouveau-né est transmise presque exclusivement par le placenta (25, 21).

En ce qui concerne l'immunité contre le tétanos, on a constaté que le sérum antitétanique administré aux femmes enceintes, peu de temps avant l'accouchement, apparaît dans le sang du nouveau-né (20), fait qui a suggéré la possibilité d'obtenir le même effet par l'immunisation active des futures mères. De pareils essais ont été entrepris également par NATHAN-LARRIER (19) LEACH et coll. (15, 29), MAGARA et coll. (17), DEBRÉ, RAMON et coll. (9), LEMETAYER et coll. (16) et d'autres auteurs.

De toutes ces recherches, il ressort que l'antitoxine spécifique élaborée par la mère au cours de la grossesse, à la suite de l'immunisation, se transmet au nouveau-né. En ce qui concerne le rapport quantitatif entre la valeur antitoxique du sérum maternel et celui du nouveau-né, — à l'exception de LEACH et coll. (15) qui constatent que chez les mères immunisées par 2 injections d'anatoxine seulement 10% de la valeur antitoxique du sérum passe à travers le placenta, alors que par l'immunisation complète avec 3 injections les antitoxines sont transmises à l'enfant en proportion de 51% — d'autres auteurs constatent chez le nouveau-né des titres égaux à ceux de la mère, ou légèrement inférieurs (12,17). Dans la majorité des cas, après la vaccination complète de la mère, les titres des nouveau-nés étaient suffisamment élevés pour assurer la protection. Mentionnons que ces affirmations doivent être considérées sous réserve, vu que dans des recherches antérieures, la détermination de petites quantités d'antitoxine a été effectuée par des méthodes peu précises.

Une campagne de vaccination des femmes enceintes, entreprise dans le sud de l'Amérique du Nord, a montré que l'incidence du tétanos neonatorum (1) était tombée à zéro. Afin de prévenir le tétanos chez les nouveau-nés, l'immunisation antitétanique active des femmes enceintes a été recommandée par une série d'auteurs compétents, parmi lesquels SCHEIBEL (Danemarque, 24). De même CONDREA, en Roumanie, (8a) a préconisé, en 1940, la vaccination antitétanique préventive des femmes enceintes, appartenant au milieu rural. Tenant compte de ces considérations, nous avons entrepris en collaboration avec l'ancien Centre d'Obstétrique et de Gynécologie, la vaccination des femmes enceintes avec de l'anatoxine tétanique, pour voir dans quelle mesure ce procédé réaliserait un titre antitoxique protecteur dans la sang du nouveau-né.

En même temps, nous avons entrepris une étude expérimentale sur cobayes (animaux qui présentent le même type de placenta, hémochorial, que l'homme) afin d'étudier dans quelle mesure le niveau de l'antitoxine d'origine maternelle du sérum du nouveau-né, reflète l'état réel de la résistance de ce dernier vis-à-vis de la toxi-infection tétanique.

I. Recherches cliniques

On a vacciné à l'anatoxine tétanique, produite par l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », des femmes d'âges différents au cours du 5-e au 8-e mois de grossesse. La vaccination a été effectuée par 3 doses souscutanées, séparées par 30 jours d'intervalle entre la première et la seconde inoculation et par 7 jours entre la seconde et troisième, avec 1 ml pour la première inoculation et 2 ml pour les suivantes. Pour différentes raisons, une partie des femmes n'ont plus reçu la troisième dose.

L'accouchement a eu lieu après des intervalles qui ont varié entre 2 et 90 jours (généralement après 20-45 jours suivant la dernière inoculation). Au moment de la naissance, on a récolté du sang veineux de la mère et du cordon ombilical, en déterminant le niveau d'antitoxine tétanique circulante chez la mère et le nouveau-né. Bien que la vaccination ait été apliquée à un assez grand nombre de femmes enceintes, les déterminations d'antitoxine n'ont pu être pratiquées que sur 18 paires de sérums, dont 8 des mères complètement vaccinées (trois injections) et 10 ayant reçu seulement 2 injections d'anatoxine tétanique.

Dans des recherches antérieures sur la présence de l'immunité occulte chez l'homme et chez l'animal apparement normal, le titrage des anticorps avait été effectué d'après la méthode mise au point à l'Institut Cantacuzino, selon les principes d'Ehrlich qui permettent de déceler des quantités minimes d'antitoxine (à partir de 1/30.000 U.A/ml) (8, 10).

Dans le présent ouvrage, le titrage a été fait d'après la méthode basée sur les mêmes principes, mise au point par Haliapina et décrite par Sumakova (27). La dose-test de toxine utilisée a été déterminée vis-à-vis de 1/200 U.A. Ainsi, on a pu mettre en évidence des quantités d'antitoxine à partir de 0,005 U.A.

RESULTATS

La vaccination a été bien supportée par les femmes enceintes, n'influençant aucunement l'évolution de la grossesse ou de l'accouchement, les titres de l'antitoxine tétanique dans le sérum sanguin des mères vaccinées et du cordon ombilical des nouveau-nés variant entre 0,005 et 1 U.A./ml.

Dans 11 sur 18 cas, le titre du nouveau-né dépassait 0,01 U.A./ml — valeur considérée par la majorité des auteurs comme limite minimum d'antitoxine assurant la protection contre le tétanos (4, 26, 28). Étant donné que l'une des mères vaccinées avec 2 injections d'anatoxine a reçu la seconde inoculation 2 jours avant d'accoucher — intervalle insuffisant pour l'installation de l'immunité — et que ce cas n'a pas été pris en considération, la protection des nouveau-nés immuns a été de 11/17.

Sur 8 femmes enceintes complètement vaccinées, on n'a trouvé qu'un seul cas présentant le titre de la mère et de l'enfant inférieur à la limite de protection.

On a constaté que le délai de 12 jours (le plus court entre la fin de la vaccination et la délivrance) suffit à l'accomplissement de l'immunisation de la mère et de l'enfant.

En ce qui concerne le rapport entre le niveau de l'antitoxine tétanique du sang maternel et celui du cordon ombilical, on a constaté: dans 9 cas égalité des titres, dans 5 cas des titres supérieurs à ceux de la mère chez les nouveau-

nés, dans 4 cas des titres inférieurs dans le cordon ombilical, par rapport à ceux du sang maternel.

Dans le tableau I sont consignés les titres de l'antitoxine tétanique du sérum des mères et ceux des épreuves respectives du cordon ombilical.

Tableau I

Titres de l'antitoxine tétanique des mères vaccinées et des nouveau-nés

Numéro courant	Mères	Nombre d'injections d'anatoxine	Intervalle (jours) entre la dernière injection et l'accouchement	Titre des anticorps	
				Mère	Enfant
1	S.S.	2	2	<0,005	<0,005
2	A.V.	2	8	<0,001	0,001
3	B.V.	2	17	0,5	0,01
4	D.P.	2	30	0,5	0,05
5	I.E.	2	?	0,5	1
6	I.Z.	2	30	0,005	<0,005
7	P.F.	2	30	>0,01 <0,025	<0,01
8	D.G.	2	30	<0,005	<0,005
9	N.M.	2	90	>0,01 <0,05	>0,01 <0,05
10	K.J.	2	25	<0,005	<0,005
11	P.I.	3	12	>0,05 <0,1	>0,01 <0,05
12	D.G.	3	19	0,25	0,5
13	V.F.	3	20	0,25	0,25
14	Gh. T.	3	26	>0,1 <0,5	>0,1 <0,5
15	N.M.	3	55	<0,005	<0,005
16	Gh. F.	3	31	0,01	>0,01 <0,05
17	Z.P.	3	35	0,01	0,01
18	B.Z.	3	44	0,01	>0,01 <0,05

II. Recherches expérimentales

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les recherches ont été faites sur des femelles adultes de cobaye de 370—550g, vaccinées au cours de la gestation par 2 inoculations de 0,5 ml anatoxine tétanique.

Des essais préliminaires d'immuniser les femelles au moment où l'on pouvait apprécier l'état de gestation ont montré que ce procédé n'est pas pratique, vu que l'intervalle de 3—4 semaines précédant la mise bas, est insuffisant pour la vaccination et l'élaboration d'un niveau satisfaisant d'antitoxine. Pour éviter ces inconvénients, on a adopté la méthode suivante: on a laissé les cobayes femelles en contact avec les mâles (1 mâle pour 6 — 7 femelles) pendant 6 — 8 semaines, intervalle pendant lequel toutes les femelles ont été immunisées à l'anatoxine tétanique, la première dose étant administrée 17 jours après le début de l'expérience et la seconde à 17—24 jours après la première inoculation, sauf si l'état de gestation imposait le raccourcissement de l'intervalle entre les inoculations. De cette manière, la majorité des animaux ont reçu les 2 inoculations vaccinantes au cours de la période de gestation (60—68 jours chez les cobayes), une partie recevant la première inoculation avant la gestation et la deuxième pendant la

période de gestation, à l'exception de 3 cas, chez lesquels 2 doses ont été administrées avant la période de gestation. Les femelles ont mis bas par 1—3 animaux, à intervalle de 13—60 jours à partir de la dernière dose vaccinante (excepté 2 animaux chez lesquels l'intervalle était de 2 et respectivement 4 jours et les 3 cas cités plus haut, où la vaccination a eu lieu avant la période de gestation et la mise bas à 71—83 jours après la vaccination).

Les animaux vaccinés, restés inféconds, ont servi de témoins afin de comparer la réponse immunologique de l'organisme, au cours de la période de gestation et dans les conditions habituelles.

L'immunité antitétanique des nouveau-nés, des femelles mères et des femelles témoins a été contrôlée par 3 méthodes:

a) détermination du titre de l'antitoxine tétanique dans le sérum sanguin;

b) test de résistance vis-à-vis de la toxine tétanique;

c) test de résistance des animaux à l'infection par spores tétaniques.

Pour le titrage des antitoxines sériques, les cobayes étaient saignés par ponction cardiaque, prélevant par 2—4 ml sang des femelles et 1—2 ml des petits, qui le plus souvent étaient sacrifiés à cette occasion. Les titrages ont été exécutés selon la technique employée pour les sérums humains, mentionnée dans la première partie de ce travail.

Le test de résistance à la toxine tétanique a été effectué par inoculation souscutanée aux cobayes âgés de 1—2 jours, de 1—4 DMM toxine stabilisée (la DMM déterminée pour les petits de 60—80 g). La résistance des femelles-mères et des témoins a été contrôlée par inoculation souscutanée de 200 DMM toxine (cobayes de 350 g), 7—9 jours après la mise bas (intervalle choisi pour éviter aux jeunes cobayes intoxiqués des quantités supplémentaires de toxine ou antitoxine transmises par le lait maternel, ainsi que la suppression de l'allaitement dès les premiers jours par la mort éventuelle des mères ne résistant pas à l'intoxication).

Pour le contrôle de la résistance à l'infection avec spores tétaniques, on a inoculé par voie intramusculaire (cuisse) aux cobayes âgés de 1 à 6 jours, ainsi qu'aux mères (7—21 jours après la mise bas), 1—2 DCL d'une suspension de spores tétaniques en eau physiologique, mélangée en parties égales avec une solution de $CaCl_2$ 25%, administrée en quantité totale de 0,2 ml. La dose certe létale de spores s'avérant être la même pour les petits que pour les adultes, dans la majorité des inoculations avec spores, on a utilisé des témoins normaux de 350 g et seulement dans quelques cas des cobayes jeunes.

Les recherches comportaient 3 séries d'expériences: dans la première on a poursuivi la résistance à la toxine tétanique des mères, des petits et des témoins (femelles non-gestantes), ainsi que le titre des antitoxines sériques de ces animaux; dans les 2 autres séries d'expériences, on a contrôlé la résistance à l'infection avec spores tétaniques chez les mères, les petits et les témoins respectifs, parallèlement au titrage des anticorps sériques.

Généralement, on a procédé comme suit: si une femelle mettait bas 2 ou 3 petits, l'un d'eux était saigné les premiers 2 jours pour le titrage de l'antitoxine, les autres étant testés par la toxine ou les spores tétaniques; si elle en avait un seul, le petit servait, le plus souvent, au contrôle de la résistance à la toxine ou aux spores, aspect qui nous a le plus intéressé dans nos recherches sur les animaux. Les cobayes-mères étaient saignées 4—6 jours après

la mise bas et ultérieurement testées avec de la toxine ou des spores. Le plus souvent, en même temps que les mères, on saignait et inoculait avec de la toxine ou des spores par 1—2 femelles témoins immunisées, mais non-gestantes.

RÉSULTATS

a) Titres des antitoxines tétaniques des cobayes nouveau-nés, des mères et des témoins. Le titrage de l'antitoxine sérique a été effectué sur 32 cobayes-mères (dont 23 avaient mis bas des cobayes vivants), 16 témoins et 21 nouveau-nés. Généralement, on a obtenu des titres entre 0,01 et 1 U.A/ml et, dans de rares cas, des titres inférieurs ou supérieurs à ces limites, atteignant 5 U.A. et même plus. Dans le tableau III sont consignés les titres des cobayes-mères et de leurs petits; de ce tableau on peut constater que seulement 3 cobayes-mères ont donné des titres inférieurs à 0,01 U.A/ml sérum — limite minimum de protection. Ce n'est que tout au plus dans 3 cas des 21 cobayes nés de mères immunisées que le titre du sérum a été probablement inférieur à 0,01 U.A./ml — limite minimum de protection (vu les quantités réduites de sérum obtenues de ces jeunes animaux on n'a pu titrer moins de 0,05 U.A., les titres obtenus étant inférieurs à ces chiffres). Dans 2 cas, les titres des cobayes-mères ont été sous la limite minimum de protection (0,01 U.A./ml).

Dans 19 cas, on a pu titrer parallèlement les sérums des petits et des mères respectives. Excluant les 3 sérums des cobayes cités plus haut, chez lesquels la valeur réelle de l'antitoxine n'a pu être estimée, dans 12 cas les titres des petits étaient plus élevés que ceux des mères respectives, dans 3 ils ont été égaux et dans un seul cas inférieur à celui de la mère.

On n'a pas remarqué de différences significatives dans l'élaboration des antitoxines parmi les femelles immunisées au cours de la gestation et des témoins non-gestantes. Dans le tableau II, nous exposons quelques exemples de titres antitoxiques des mères et témoins respectifs, immunisés et saignés aux mêmes dates.

Tableau II

Titres de l'antitoxine tétanique chez les cobayes femelles, vaccinées pendant la période de gestation et chez les femelles témoins

Titre de l'anatoxine tétanique (en U. A./ml)		
Groupe	Cobayes gestantes	Témoins respectifs
1	$> 0{,}1 < 0{,}5$	$> 0{,}1 < 0{,}5$ $> 0{,}5 < 1$
	0,5	0,5
2	$> 0{,}1 < 0{,}5$ $> 0{,}5 < 1$	$> 0{,}5 < 1$
3	0,1	$> 0{,}1 < 0{,}5$
		0,1
	0,5	
4	$> 0{,}1 < 0{,}5$ $> 1 \quad < 2$	0,5

b) Résistance à la toxine tétanique des nouveau-nés et des cobayes-mères comparativement aux témoins. Le test de résistance à la toxine tétanique a été effectué sur 12 petits provenant de 10 femelles; 11 ont résisté à 1—4 doses mimima mortelles de toxine tétanique (pour des petits entre 60—80 g); le 12-e a succombé (à remarquer que sa mort aurait pu être due aussi à d'autres facteurs, vu que la mère avait reçu la 2-e dose d'anatoxine 4 jours avant la mise bas et qu'elle est morte d'une congestion pulmonaire, 4 jours après la naissance du petit).

Des 12 femelles immunisées contre le tétanos, durant la période de gestation, 11 ont résisté à 200 DMM (dose établie pour des cobayes de 350 g) toxine tétanique; de 7 témoins non-gestantes, 6 ont résisté, à la même dose. Il résulte que, dans nos conditions d'expérience, la résistance à la toxine tétanique acquise par les femelles gestantes immunisées n'a pas été inférieure à la résistance conférée aux témoins par l'immunisation.

c) Résistance des cobayes-mères et des nouveau-nés à l'infection par spores tétaniques. Avant d'exposer les résultats obtenus, il faut faire mention des quelques particularités de l'infection expérimentale, réalisée par l'inoculation de spores tétaniques additionnés de $CaCl_2$ 25%.

Vingt-quatre heures après l'inoculation des spores, on pouvait déceler, par palpation du membre inoculé, une tuméfaction conduisant souvent à une nécrose superficielle (phénomène décelable aussi chez les animaux inoculés seulement avec $CaCl_2$ 25% sans spores). Dans certains cas, on a observé une légère impotence du membre inoculé.

La dynamique du tétanos expérimental chez les animaux non-immunisés (qui ont servi au titrage de la suspension de spores, ou comme témoins) revêt un caractère spécial. Les symptômes de tétanos apparaissent après une incubation de 48—72 heures, tandis qu'en administrant de la toxine, la contracture locale apparaît dès les premières 24 heures. Par contre, l'évolution du tétanos chez les animaux inoculés avec spores est extrêmement rapide, provoquant la mort en 10—24 heures.

Une évolution semblable a été observée par CIORNAIA (6) chez les souris inoculées avec des spores tétaniques, en comparaison à celles inoculées avec de la toxine. Ce phénomène est explicable par le fait que, dans le tétanos provoqué par l'inoculation de la toxine, l'entière quantité agit à la fois sur l'organisme, alors que le tétanos obtenu par inoculation de spores (pareillement à ce qui se produit en conditions naturelles) nécessite un intervalle de temps pour la transformation et la multiplication des spores en formes végétatives, ce qui a comme suite la pénétration de certaines quantités croissantes de toxine dans l'organisme, quantités qui augmentent très rapidement et ont une action continue sur les tissus sensibles.

Nos expériences ont été effectuées en inoculant les animaux par 1 à 2 DCL spores tétaniques en $CaCl_2$ 25% (17 petits provenant de 11 mères, 11 cobayes-mères dont 2 ont mis bas des petits morts et 6 témoins immunisées, non-gestantes).

Ainsi que l'indique le tableau III, neuf des petits inoculés ont résisté à l'infection, présentant dans quelques cas un léger tétanos local et dans un cas un tétanos généralisé, guéri par la suite. Ceux qui n'ont pas survécu à l'infection ont fait une maladie à évolution prolongée, succombant 1 à 3 jours plus tard par rapport aux témoins non-immunisés.

Tableau III

Le titre de l'antitoxine tétanique et la résistance à la toxine ou aux spores tétaniques des petits et des cobayes-mères immunisées

Cobayes-mères	Intervalle (en jours) entre la denière inoculation et la mise-bas	Titre antitoxique		Résistance à la toxine				Résistance aux spores tétaniques			
				cobaye-mère		petit		cobaye-mère		petit	
		cobaye-mère	petit	DMM	résultat	DMM	résultat	DCL	résultat	DCL	résultat
No. 7	49	>0,1 <0,5	0,5	200	S	2	S	—	—	—	—
No. 8	39	5*	>5	200	S	2	S	—	—	—	—
						4	S			—	—
No. 13	79	>0,1 <0,5	>0,1 <0,5	200	S	4	S	—	—	—	—
No. 15	28	>0,05<0,1	>0,05<0,1	200	S	1	S	—	—	—	—
						1	S			—	—
No. 18	53	>0,5<1	>0,5 <1	200	S	2	S	—	—	—	—
No. 20	59	>1 <2*	>2 <5	200	S	10	S	—	—	—	—
No. 26	32	1	2	1000	S	—	—	—	—	—	—
No. 27	13	0,02	0,05	—	—	4	S	—	—	—	—
No. 30	19	0,05	0,1	—	—	—	—	1,5	+	1,5	+
No. 31	30	0,1	>0,1 <0,5	—	—	—	—	1	+	1	S
						—	—			1,5	+
No. 40	2	0,005	>0,01<0,05	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 43	45	1	>0,5<1	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 46	68	0,5	1	—	—	—	—	2	+	1	+
						—	—			2	S

No. 47	83	1	>1	—	—	—	—	—	—	2	+
						—	—			2	+
No. 48	19	<0,01	<0,05	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 49	20	<0,01	<0,05	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 52	20	0,5	>1	—	—	—	—	2	S	1	S
No. 54	45	0,5	1	—	—	—	—	—	—	2	+
No. 56	71	>0,1 <0,5	>0,5 <1	—	—	—	—	1	S	1	+
						—	—			1	S
						—	—			1	S
No. 41	68	—	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—
No. 42	42	—	>0,5 <1	—	—	—	—	—	—	1	+
						—	—			2	S
No. 5	28	—	—	—	—	1	S	—	—	—	—
No. 19	4	—	—	—	—	1	+	—	—	—	—
No. 25	55	2	—	200	S	10	S	—	—	—	—
No. 29	10	—	—	—	—	—	—	1	S	1	S
No. 37	42	2	—	—	—	—	—	1	S	1	S
No. 55	60	—	—	—	—	—	—	1	S	1	S

* Les deux animaux ont reçu une immunisation supplémentaire par 200 DMM toxine tétanique, étant utilisés comme témoins non-gestantes, dans une périodé où la grossesse n'était pas encore décelable.

LÉGENDE:

S = les animaux ont survécu à l'administration de toxine ou de spores tétaniques.
\+ = les animaux ont presenté un tétanos mortel après l'administration de toxines ou de spores tétaniques.

On remarque une corrélation assez étroite entre la résistance des nouveau-nés et les cobayes-mères. Ainsi, les petits des 6 mères qui ont résisté à l'infection, ont tous été résistants; les petits d'autres 3 mères, qui ont fait une infection mortelle, se sont comportés comme suit: dans un cas l'unique petit n'a pas résisté et, dans chacun des autres 2 cas, des deux petits un seul s'est montré résistant.

Du total de 11 femelles immunisées dans la période gestante, 8 ont survécu à l'infection et 3 ont fait une infection mortelle, à évolution prolongée pareille à celle du cobaye jeune, la mort survenant avec un retard de 2—7 jours par rapport à celle des témoins non-immunisées. De 6 femelles témoins, non-gestantes, 4 ont survécu à l'infection et 2 sont mortes (tardivement par rapport au témoins non-immunisées).

DISCUSSION

Dans le but de prévenir l'apparition de maladies infectieuses telles la variole, la coqueluche, la grippe, la diphtérie et le tétanos, nombreaux auteurs ont essayé d'immuniser le nouveau-né par vaccination de la mère au cours de la gestation (7, 9, 12, 17, 19, 23), obtenant des résultats variables, souvent favorables. De toutes ces affections c'est dans le cas du tétanos que le nouveau-né bénéficie le plus de cette méthode prophylactique: d'abord, parceque l'infection tétanique possible à la naissance même (ou peu de temps après) trouve un organisme presque complètement dépourvu d'immunité spécifique; d'autre part, les anticorps transmis passivement par la mère peuvent être plus efficaces dans une affection telle que le tétanos, dans la pathogénie duquel une toxine détient le rôle principal.

De l'examen des résultats obtenus sur un nombre restreint de femmes enceintes, chez lesquelles on a réussi à déterminer l'antitoxine dans le sérum, on constate que la vaccination complète avec l'anatoxine tétanique, administrée dans la seconde partie de la grossesse, a donné dans la majorité des cas un titre antitoxique satisfaisant pour la mère, ainsi que pour le nouveau-né et que même dans les cas de vaccination incomplète (2 inoculations) capables d'immuniser la mère, la plupart des nouveau-nés ont également bénéficié de l'immunisation.

En ce qui concerne la corrélation quantitative des titres antitoxiques du sang maternel et du cordon ombilical, les titres les plus élevés (parfois 100%) décelés par nous dans le sang ombilical, coïncident avec les constatations de Barr et coll. (3) selon lesquels les titres de l'antitoxine diphtérique du cordon ombilical dépassent (atteignant parfois jusqu'à 50%) les titres du sérum de la mère. Murray et coll. (18) trouvent, de même, des titres d'antistreptolysine «0» de 63% plus élevés en moyenne dans le cordon ombilical que dans le sang maternel correspondant. Doerr (11) a essayé d'expliquer ce phénomène en admettant la possibilité de la concentration des anticorps dans le placenta. Ces grandes différences en faveur du titre foetal peuvent être mises en liaison avec les constatations concernant le niveau des gamma-globulines du sang ombilical, niveau considérablement plus élevé que dans le sang de la mère (23).

Les mêmes différences des titres, mais parfois plus accentuées, ont été trouvées dans le sérum des cobayes nouveau-nés, par rapport aux valeurs rencontrées dans le sang des cobayes-mères vaccinées.

Les résultats que nous avons obtenu chez les cobayes sont en contradiction avec ceux de BARNES, qui affirme que les nouveau-nés, provenant de cobayes- mères avec immunité antidiphtérique, possèdent un titre antitoxique environ 2 fois plus élevé que celui de la mère, seulement dans le cas où les femelles ont été immunisées avant la conception; selon cet auteur, les petits des mères immunisées pendant la gestation possèdent une quantité plus réduite d'antitoxine sérique, dépourvue de corrélation avec le titre de la mère (2).

Il est probable que ces résultats, différentes des nôtres, tiennent au fait que dans les expériences de BARNES, les animaux inoculés au cours de la gestation ont reçu une dose unique d'anatoxine, suivie d'une réponse antitoxique plus lente. L'auteur consigne d'ailleurs les résultats d'un autre expérimentateur — HARTLEY — qui trouve que l'antitoxine homologue, inoculée à un stade avancé de la gestation, est rapidement transférée, les titres du nouveau-né se trouvant plus élevés que celui de la mère.

L'immunisation des cobayes gestantes par deux injections à 0,5 ml anatoxine tétanique a assuré, dans nos expériences, la protection des nouveau-nés envers 1 à 4 doses minima mortelles de toxine (doses nouveau-nés = 1/2 à 2 doses adultes).

La résistance des petits à l'infection avec spores tétaniques, inoculés en même temps avec une solution de $CaCl_2$, a donné des résultats moins favorables (9 sur 17, soit 53%); chez les petits qui n'ont pas survécu on a cependant remarqué une période d'incubation prolongée et surtout un ralentissement de l'évolution de la maladie, la mort étant retardée de 3 jours, par rapport aux témoins non-immunisées. Ce fait présente de l'importance pour le traitement du tétanos, étant donné que le ralentissement de l'évolution augmente les chances de réussite du traitement avec de l'antitoxine chez les nouveau-nés immunisés par voie diaplacentaire, mais qui font néanmoins la maladie. Il est à remarquer que, dans plusieurs cas, les petits d'une seule portée ne réagissent pas de manière égale vis-à-vis de l'infection avec spores: les uns ont été résistants, alors que d'autres ont succombé. Étant donné que les femelles multipares ont plusieurs placentas, il serait possible que les anticorps ne se transmettent pas de manière égale à tous les nouveau-nés. D'autre part, le fait que dans la plupart des cas le petit inoculé quelques jours plus tard que ses frères a résisté à l'infection, ce qui peut sembler paradoxal (vu que le niveau de l'antitoxine sérique peut diminuer pendant cet intervalle), nous laisse entrevoir la possibilité de l'intervention, en plus des anticorps spécifiques, d'autres facteurs immunisants (éventuellement tissulaires) dans le mécanisme de la résistance à l'infection tétanique des petits provenant de mères immunisées. Ces facteurs faiblement représentés ou avec des possibilités minimum d'action immédiatement après la naissance, peuvent être mis en valeur au cours des premiers jours de l'existence extra-utérine. Les recherches de KOZLOVSKAIA (14) semblent également plaider dans ce sens; cet auteur a constaté que les lapins provenant de mères immunisées avec le virus de la rougeole, réimmunisés avec le même virus, ont donné une meilleure réponse que les témoins provenant de mères non-immunisées. L'auteur arrive à conclure qu'à part les anticorps transmis par voie passive, les petits héritent de la mère immune « un état immunologique spécial », c'est-à-dire l'aptitude d'élaborer ultérieurement les anticorps respectifs.

Quant au rapport entre le niveau de l'antitoxine du sérum des nouveau-nés et leur immunité antitétanique réelle, on constate chez les petits (dans la presque-totalité des cas) une résistance à la toxine tétanique correspondant au titre de de 0,05 UA/ml ou même inférieure à ce chiffre; par contre, la résistance à l'infection avec spores tétaniques ne paraît pas être en stricte corrélation avec le titre de l'antitoxine (dans les limites où les titres obtenus chez les petits d'une même portée ont oscillé entre 0,1 et 1 UA/ml). Nous avons eu des cas où les animaux ayant 0,1—0,5 UA/ml ont survécu et d'autres où, malgré le titre de 1 UA/ml, les petits n'ont pas résisté à l'infection. Ce fait indiquerait que d'autres facteurs, à part les anticorps spécifiques, interviennent dans le mécanisme de l'immunité vis-à-vis de l'infection tétanique, réalisée dans des circonstances les plus proches des conditions naturelles. Ainsi que nous l'avons déjà montré, le manque de résistance des petits correspondait le plus souvent à une faible immunisation des cobayes-mères respectives, qui, de leur côté, n'ont pas survécu à l'infection. D'ailleurs, on peut également constater (26) que les cobayes adultes, immunisés avec des quantités importantes (3 injections à 1, 1,5 et 1,5 ml) d'anatoxine tétanique fluide, ne résistent à l'infection par spores tétaniques que dans un proportion d'approximativement 75%, le taux de résistance de 100% n'étant réalisé que par l'anatoxine précipitée ou adsorbée.

Il convient de souligner que le contrôle parallèle de la réponse immunologique des cobayes gestantes et des femelles-témoins (non-gestantes) n'a pas donné de différences significatives, les gestantes s'immunisant au même degré que les témoins.

Il va de soi que les résultats obtenus sur les cobayes ne peuvent être rapportés identiquement à l'homme. Tenant compte du volume total de sang circulant, de beaucoup plus réduit chez le cobaye que chez l'homme, il est possible que pour juguler l'infection tétanique de cet animal, des quantités plus élevées d'antitoxine soient nécessaires.

Le critérium le plus sûr pour apprécier l'efficience de la vaccination antitétanique des femmes enceintes comme méthode prophylactique pour le tétanos des nouveau-nés, reste celui du contrôle épidémiologique, sur un grand nombre de femmes enceintes (judicieusement triées) vaccinées ou non-vaccinées.

CONCLUSIONS

Une série de recherches cliniques et expérimentales ont été entreprises sur l'immunisation antitétanique des nouveau-nés par la vaccination des mères pendant la période de gestation.

La vaccination à l'anatoxine tétanique a été bien tolérée; elle n'a pas été suivie de réactions locales, ni d'accidents influençant l'évolution normale de la grossesse et de l'accouchement.

Les titres de l'antitoxine tétanique des nouveau-nés (épreuves du cordon ombilical) et des mères vaccinées par 2 ou 3 inoculations d'anatoxine (effectuées au moins 12 jours avant la naissance) ont dépassé, dans 11 sur 17 cas, 0,01 UA/ml, valeur considérée comme limite minimum d'antitoxine qui assure la protection contre le tétanos. Sur 8 femmes enceintes avec vaccination complète (3 inocu-

lations d'anatoxine), dans un seul cas le titre de la mère et de l'enfant a été inférieur à la limite minimum de protection.

Dans une série de cas, les titres de l'antitoxine tétanique obtenus chez le nouveau-né ont été supérieurs aux titres antitoxiques maternels — fait rencontré plus souvent chez les cobayes; l'explication de ce phénomène est discutée.

Les cobayes nouveau-nés provenant de mères immunisées au cours de la gestation ont presque tous résisté (11 sur 12) à 1—4 doses minima mortelles de toxine tétanique.

Infectés avec spores tétaniques (1—2 DCL en $CaCl_2$ 25%), les animaux ont survécu dans une proportion de 9 sur 17. Ceux qui n'ont pas résisté ont présenté une évolution prolongée de la maladie de un à 3 jours, par rapport aux témoins non-immunisés. On constate un parallélisme assez étroit entre la résistance à l'infection des petits et des cobayes-mères; dans 3 cas au moins, le manque de résistance des petits était dû à la faible immunisation des cobayes-mères, qui de même n'avaient pas résisté à l'infection aux spores.

On n'a pas constaté de différences quant à la réponse immunologique (contrôlée par les trois voies: titre antitoxique, résistance à la toxine, résistance à l'infection avec spores) des cobayes gestantes en comparaison avec les animaux témoins non-gestantes.

Nous considérons que, par immunisation antitétanique complète des femmes enceintes dans le second stade de grossesse, on peut réaliser l'immunisation des nouveau-nés en proportion élevée. Une large vérification sur le terrain de l'efficacité de ce procédé (fondée sur l'enregistrement de la morbidité) s'impose.

BIBLIOGRAPHIE

1. Axnick N. W. et Russell. E. — Am. Journal Publ. Health 1957, **47,** 1493
2. Barnes J. M. — Journal of Path. and Bact., 1959, **77,** 371.
3. Barr M., Glenny A. T. et Randall K. I. — Lancet, 1949, **257,** 324.
4. Bergey D. H., Brown C. L. et Etris S. — Am. Journ. Publ. Health, 1939, **29,** 334.
5. Chauveau A. — C.R. Ac. Scien., 1880, **91,** 148.
6. Ciornaia L. A. — Anaeroboie infecţii Gosmedizdat U.R.S.S., Kiev, 1957, 157.
7. Cohen Ph. et Scadron S. I. — Journal American Medical Association 1943, **121,** 656.
8. Condrea P., Poenaru E. et Dima G. — C.R. Soc. Biol., 1937, **125,** 768.

8a. Condrea P. — Rev. Ig. Soc., Bucarest 1940, **10,** 3.

9. Debré R., Ramon G. et Thiroloix P. L. — C.R. Soc. Biol., 1930, **103,** 383.
0. Dima G. — Thèse de doctorat, Bucarest, 1936.
1. Doerr R. — Schweiz. Med. Wochenschrift, 1941, **71,** 1253.
2. Edsall G. — Ann. N. Y. Ac. Sc., 1956, **66,** 32.
3. Ehrlich P. et Hubener W. — Zbltt. Hyg. Infektionskrankheit, 1894, **18,** 51.
4. Kozlovskaia L. I. — Voprosî virusologhii, 1957, **2,** 220.
5. Leach C. N., Zia S. N. et Lim K. T. — Am. Journ. Hyg., 1936, **24,** 439.
6. Lemetayer E., Nicol L., Grasset J., Gauttier R. et Pialoux J. — Bull. Ac. Nat. Med., 1950, **124,** 2.
7. Magara M. et Adukata K. — C.R. Soc. Biol., 1937, **125,** 782.
8. Murray J. et Calman R. — Brit. Med. J., 1953, Nr. 4800, 13.
9. Nathan-Larrier J., Ramon G. et Grasset J. — Ann. Inst. Pasteur, 1927, **41,** 848.
0. Polano O. — Zeitschrift-Geburtshilfe u. Gynäk., 1904, **53,** 456.
1. Ratner B., Jackson M. et Gmehl M. — J. Immunol., 1927, **14,** 257.

22. Ritossa P. — Aggiorn. Pediatr., 1957, **8**, 9.
23. Sandor G. et Sandor M. — Ann. Inst. Pasteur, 1957, **92**, 132.
24. Scheibel I. — Bull. O.M.S., 1955, **12**, 381.
25. Schneider G. et Szathmary J. — Ztschr. Immunitätsforsch., u. exper. Therap,. 1939, **95**, 465.
26. Sneath P. A. T., Kerslake A. G. et Scruby F. — Am. Journ. Hyg., 1937, **25**, 464.
27. Sumakova G. V. — Voprosî infekţionnoi patologhii i immunologhii, Medghiz, No. 2. 1954, 127.
28. Wolters K. et Fishoeder E. — Ärztliche Wochenschrift, 1953, **23**, 537.
29. Zia S. N., Lim K. T. et Leach C. N. — Revue d'immunol., 1936, **2**, 260.

ПРОТИВОСТОЛБНЯЧНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ НОВОРОЖДЕННЫХ ПРИ ПОМОЩИ ВАКЦИНАЦИИ В ТЕЧЕНИЕ БЕРЕМЕННОСТИ. КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы осуществили ряд клинических и экспериментальных исследований для противостолбнячной иммунизации новорожденных при помощи вакцинации матерей в периоде беременности.

Титры антитоксина у новорожденных детей (пробы полученные из пупочного канатика), родившихся от матерей, вакцинированных при помощи 2—3 впрыскиваний анатоксина (осуществленных самое меньшее за 12 дней до родов), превосходили в 11 из 17 случаев уровень, равный 0,01 АЕ /мл, что вообще считается минимальным пределом антитоксина, обеспечивающим защиту против заболевания столбняком. Из 8-ми беременных женщин, полностью вакцинированных (3 впрыскивания анатоксина), только в 1 случае соответствующие титры матери и ребенка были ниже минимального защитного предела.

В ряде случаев титры столбнячного анатоксина, полученные у новорожденных, были выше антитоксических титров матерей — что было установлено более часто у морских свинок. Авторы обсуждают возможное объяснение этого явления.

Детеныши морских свинок, иммунизированных во время периода беременности, оказались почти полностью резистентными (11 из 12) в отношении 1—4 минимальных летальных доз столбнячного токсина.

При заражении спорами столбняка (1—2 *DCL* в 25% растворе $CaCl_2$) детеныши морских свинок выжили в пропорции 9 их 17. Среди животных, которые не обладали сопротивляемостью к столбнячной инфекции, было отмечено более продолжительное течение заболевания — на 1—3 дня по сравнению с неиммунными контрольными животными. Был установлен достаточно выраженный параллелизм между сопротивляемостью к инфекции со стороны детенышей и морских свинок-матерей. Самое меньшее в 3 случаях отсутствие сопротивляемости у детенышей морских свинок было вызвано слабой иммунизацией морских свинок-матерей, которые оказались также нерезистентными к заражению спорами столбняка.

Не было отмечено разницы в связи с иммунологической ответной реакцией (с использованием всех 3 путей: антитоксический титр, сопротивляемость к токсину, сопротивляемость к заражению спорами столбняка) у беременных морских свинок по сравнению с контрольными, небеременными морскими свинками.

Авторы считают, что в условиях полностью проведенной иммунизации против столбняка, у беременных женщин во втором периоде беременности может быть осуществлена в большом числе случаев иммунизация новорожденных. Необходима широкая проверка действенности этого метода на местах, основанная на регистрации соответствующей заболеваемости.

IMMUNISIERUNG DES NEUGEBORENEN GEGEN TETANUS DURCH SCHUTZIMPFUNG SCHWANGERER FRAUEN. KLINISCHE UND EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden eine Reihe von klinischen und experimentellen Versuchen zur Tetanus-mmunisierung Neugeborener durch Schutzimpfung der Mütter während der Schwangerschaft urchgeführt.

Die Tetanusantitoxintiter bei neugeborenen Kinder (Blutproben aus der Nabelschnur) on Müttern, die durch 2 oder 3 Toxoideinspritzungen (mindestens 12 Tage vor der Entbin-ung) geimpft worden waren, überschritten in 11 von 17 Fällen 0,01 A.E./ml. Dieser Wert ird allgemein als die untere Grenze der gegen Tetanus schützenden Antitoxinmenge ngesehen. Von 8 vollständig geimpften Schwangeren (3 Toxoideinspritzungen), blieb nur einem Fall der Titer bei Mutter und Kind unterhalb des Schutz verleihenden Grenz-ertes.

In einer Reihe von Fällen waren die Tetanusantitoxintiter bei den Neugeborenen öher als bei den Müttern, eine Erscheinung, die häufiger bei Meerschweinchen beobachtet urde. Die Erklärung dieses Phänomens wird erörtert.

Die Jungen von während der Trächtigkeit geimpften Meerschweinchenweibchen iderstanden fast alle (11 von 12) der Einspritzung von 1—4 DLM Tetanustoxin.

Bei Infektion mit Tetanussporen (1—2 DCL in 25 proz. $cacl_2$), überlebten 9 von 17 solchen ngen. Die Tiere, die der Infektion nicht widerstanden, wiesen im Vergleich mit nicht mmunen Kontrollen eine um 1—3 Tage verlängerte Krankheitsdauer auf. Zwischen der iderstandsfähigkeit gegen die Infektion bei den Jungen und bei den Muttertieren wurde recht enger Parallelismus beobachtet. In wenigstens 3 Fällen war der Mangel an Wider-ndsfähigkeit bei den Jungen auf die schwache Immunität der Muttertiere, die der Sporen-fektion gleichfalls erlagen, zurückzuführen.

Hinsichtlich der nach allen drei Methoden (Antitoxintiter, Widerstandsfähigkeit gegen oxin, Widerstandsfähigkeit gegen Sporeninfektion) geprüften immunologischen Ansprech-rkeit, wurden keine Unterschiede zwischen trächtigen Meerschweinchenweibchen und cht trächtigen Kontrolltieren verzeichnet.

Wir glauben, dass bei vollständiger Tetanusschutzimpfung schwangerer Frauen hrend der zweiten Hälfte der Schwangerschaft, ein hoher Immunisierungsprozentsatz bei Neugeborenen erreicht werden kann. Eine ausgedehnte, auf die Verzeichnung der rbidität gegründete Nachprüfung der Wirksamkeit dieses Verfahrens in der Praxis ist wendig.

ANTITETANIC IMMUNIZATION OF THE NEWBORN AS ACHIEVED BY VACCINATION DURING PREGNANCY. CLINICAL AND EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS

SUMMARY

A series of clinical and experimental investigations have been carried out concerning tetanic immunization of the newborn by vaccination of the mothers during pregnancy.

Tetanus antitoxin titres in the newborn infants (blood samples from the umbilical cord) mothers who had been vaccinated by 2 or 3 inoculations of toxoid (administered 12 days ast before delivery), in 11 out of 17 cases exceeded the level of 0,01 A.U./ml. which is erally considered to be the lowest antitoxin amount affording protection against tetanus. of 8 pregnant women who had been given a complete course of inoculations (i.e. 3 doses oxoid), only in a single case did the titres in mother and child remain below the minimal of protection.

In a number of cases tetanus antitoxin titres in the newborns exceeded those in the hers, an occurence which was more frequently met with in guinea-pigs. The explanation of his phenomenon is discussed.

In almost all cases (11 out of 12) the offspring of female guinea-pigs immunized during gestation resisted the inoculation of 1—4 DLM tetanus toxin.

When infected with tetanus spores (1—2 DCL in 25 per cent $cacl_2$ solution), such offspring resisted in a proportion of 9 out of 17 animals. In animals which did not resist infection, the course of the disease was found to be prolonged by 1—3 days as compared to the course in non-immune controls. A rather close paralellism was recorded between the resistance to infection in the offspring and resistance in the mothers (guinea-pigs); in at least 3 cases, lack of resistance of the offspring was due to poor immunization of the mothers who did not resist infection with spores either.

No differences were recorded between the immunological responses (as estimated by all three methods, i.e. antitoxin titre, resistance to toxin, resistance to infection with spores) of female pregnant guinea-pigs and non-pregnant controls.

We consider that a complete course of tetanus immunization administered to pregannt women during the second half of pregnancy may result in a high rate of immunity in the newborns. In order to ascertain the efficiency of this procedure, large-scale field tests on the basis of morbidity records are required.

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA PATHOGÉNITÉ ET DE L'HISTOPATHOLOGIE DE L'INFECTION À *LEISHMANIA DONOVANI* CHEZ LE HAMSTER DORÉ *(CRICETUS AURATUS)*

par

Gh. Lupaşco, Aspasia Agavriloaiei et Al. Gh. Ciplea

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Malaria et des Protozoaires pathogènes)

— Manuscrit reçu le 22 mai 1961 —

La découverte de la grande susceptibilité du hamster chinois *(Cricetulus griseus)* à l'infection expérimentale avec *L. donovani* faite par Young, Smyly & Brown en 1924 constituait le point de départ d'une longue série de recherches. On espérait surtout, qu'à partir de ce fait, on pourra résoudre avec plus de facilité le problème si épineux et controversé de la transmission du Kala-Azar.

Mais, ce chapitre de la transmission, le plus fascinant peut-être de l'histoire de cette maladie et en même temps fondamental en ce qui concerne son étiologie, était destiné à cumuler pendant presque 20 ans encore « des efforts infructueux, des espérances explosives, de vaines spéculations et de fausses conclusions » (Chandler, 1936), jusqu'au moment où Swaminath, Shorrt et Anderson aient réussi la transmission expérimentale de la maladie à l'homme par des piqûres de phlébotomes nourris au préalable sur des malades de Kala-Azar.

La découverte de l'animal le plus susceptible à l'infection avec la *L. donovani*, faite vingt ans après l'identification de l'agent étiologique de la maladie, mettait à la disposition des chercheurs de vastes posibilités d'étude; de même, elle permettait des mises au point très utiles dans une série d'autres problèmes (sinon tout aussi spectaculaires que ceux de la transmission — néanmoins tout aussi importants, tels: le cycle évolutif et la biologie du parasite, la pathologie de l'infection expérimentale et les relations entre l'hôte et le parasite, la chimiothérapie de l'infection etc., etc.

Néanmoins, les recherches sur la pathologie de l'infection expérimentale sont relativement peu nombreuses, l'étude la plus minutieuse étant celle de Seleney (1925) sur le hamster chinois.

Les recherches ultérieures entreprises par Goodwin (1945), Gellhorn et coll. (1946), Harrison et Fulton (1946), Sayers (1950), Alpert (1950), Patterson (1955) tout en apportant des contributions valeureuses sur l'infection

leishmanienne du hamster, restent quand même restreintes à certains aspects limités du processus pathologique.

Ainsi, GOODWIN (1945) décrit un état d'œdème massif qui survient chez le hamster syrien pendant les derniers stades de l'infection leishmanienne, indépendamment de l'intensité de l'infection; GELLHORN (1946) tout en confirmant les observations de GOODWIN, montre qu'à partir du 46-e jour de l'infection, se développe un dégénérescence progressive amyloïde des reins.

HARRISON et FULTON (1946) étudient l'effet de l'infection avec *L. donovani* sur la rate du hamster, ainsi que la réponse de cet organe et de l'infection, en général, au traitement par de la 2-hydroxystilbamidine.

SAYERS (1950) étudie la corrélation entre l'infection avec *L. donovani* et l'hypertrophie des surrénales; ALPERT (1951) entreprend des études biochimiques dans la même direction.

Enfin, RITTERSON (1955) étudie l'influence du parasite sur l'hôte, en utilisant comme critériums d'appréciation le poids des organes de l'animal (rate, foie, reins, surrénales), le contenu en azote du foie, ainsi que les modifications histopathologiques des organes mentionnés.

Le but de nos recherches et observations a été de poursuivre, d'une part, la pathogénité de *L. donovani* et l'évolution de la maladie chez le hamster doré *(Cricetus auratus)* infecté expérimentalement et, d'autre part, la réactivité tissulaire déterminée par la présence du parasite dans la rate, le foie et la mœlle osseuse du même animal.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les observations concernant la pathogénité et l'évolution clinique de la maladie ont éte effectuées pendant plus de 3 ans sur un lot de 46 hamsters dorés *(Cricetus auratus)*, inoculés par voie intrapéritonéale avec du broyage de foie et de rate provenant de hamsters infectés expérimentalement avec des *L. donovani.*

En général, exceptant les cas où la mort de l'animal a été accélérée par une infection intercurrente, on a constamment trouvé chez les hamsters de ce lot, un parasitisme final massif, conduisant inévitablement à la mort de l'animal.

RÉSULTATS

Synthétisant les résultats de ces observations il ressort:

La durée de l'évolution de l'infection — en accord avec les données de RITTERSON — est plus courte chez le hamster doré que chez le hamster chinois, lequel, selon MELENEY, peut tolérer l'infection pendant des périodes de temps beaucoup plus longues (jusqu'à 455 jours).

Selon nos observations, la durée de survie a été en moyenne de 73 jours et la plus longue de 161 jours. Les parasites ont pu être décelés dans les frottis de rate à partir du 5-e jour du moment de l'inoculation.

Pendant les stades finaux de l'infection, les parasites ont pu être décelés dans tous les organes, inclusivement dans les reins et les surrénales, viscères qui, selon RITTERSON, ne seraient pas habituellement parasités.

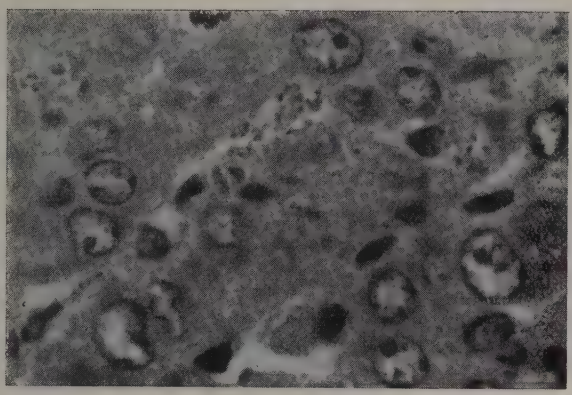


Fig. 1. — Foie de hamster (section). Hyperplasie des éléments de Kupffer, certains contenant de nombreux corpuscules de *L. donovani* dans leur cytoplasme. Nombreuses cellules hépatiques présentant des noyaux hypertrophiés ou des condensations chromatiniennes accentuées. Par place, des corpuscules *L. donovani* englobés dans le cytoplasme des cellules hépatiques. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc.10, Ob. 90.

Le parasitisme le plus intense a été constamment observé sur les empreintes de la rate, suivi par celui du foie, étant toujours beaucoup plus réduit dans les frottis de mœlle osseuse et sur les empreintes des autres organes.

En accord avec les observations d'autres auteurs, l'état général de l'animal reste apparemment inaltéré jusqu'au dernier stade de l'infection, lorsque le hamster devient apathique, les poils étant moins luisants et hérissés, la peau du museau et du scrotum présentant assez souvent un degré progressivement accentué de kératinisation et de desquamation furfuracée. Quelque fois surviennent des infections microbiennes surajoutées, localisées au même niveau, aux yeux, poches sousmaxillaires, etc.

Dans approximativement 20% des cas (9 sur 46), la mort de l'animal a été précédée par le développement de l'état d'œdème — signalé par GOODWIN en 1945 — avec liquide clair dans la cavité abdominale et infiltration massive des tissus. Chez 6 de ces 9 cas on a enregistré simultanément la dégénérescence amyloïde des reins.

Dans 3 autres cas à dégénérescence amyloïde des reins et des surrénales, la maladie a évolué sans œdème et ascite, fait expliqué par RITTERSON par l'altération précoce de la surrénale et l'insuffisance du cortex, déterminant la mort de l'animal avant l'apparition de l'œdème.

L'hypertrophie de la rate et du foie, modifications anatomo-pathologiques typiques pour l'infection avec *L. donovani*, ont été rencontrées dans tous les cas. Dans approximativement 10% des cas (5 sur 46) le foie présentait une dégénérescence graisseuse, cette lésion étant accompagnée — dans 2 cas — de lésions amyloïdiques des reins et œdème généralisé avec ascite.

Les ensemencements du liquide d'ascite, pratiqués dans le but d'isoler l'agent biologique, ont toujours donné de résultats négatifs, ce qui concorde avec les données de la littérature.

Un hamster, sacrifié le 67-e jour après l'inoculation, présentait, en plus de l'hypertrophie de la rate et du foie, des lésions inflammatoires et ulcératives de l'intestin, une inflammation du mésentère, ainsi que l'hypertrophie des ganglions mésentériques, le plus hypertrophié de ces ganglions étant suppuré.

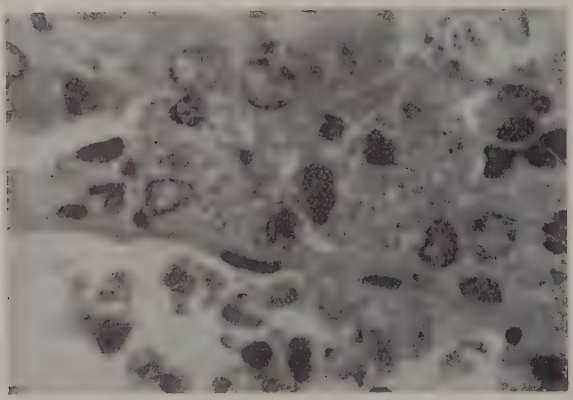


Fig. 2. — Foie de hamster (section). Nombreux histiocytes, dans l'espace de Kiernan, contenant dans le cytoplasme un grand nombre de leishmanias. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

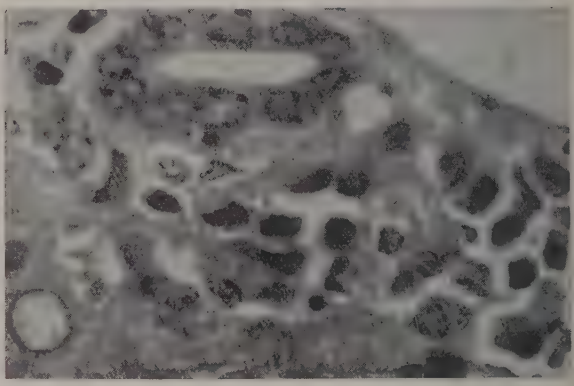


Fig. 3. — Foie de hamster (section). Nid de plasmocytes dans l'espace de Kiernan et quelques histiocytes ayant englobé des leishmanias. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

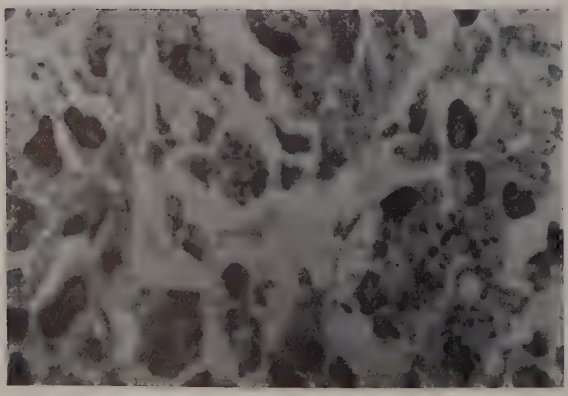


Fig. 4. — Rate de hamster (section). Nombreuses cellules réticulaires et endothéliales de capillaire sinusoïde, contenant dans le cytoplasme un grand nombre de leishmanias. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

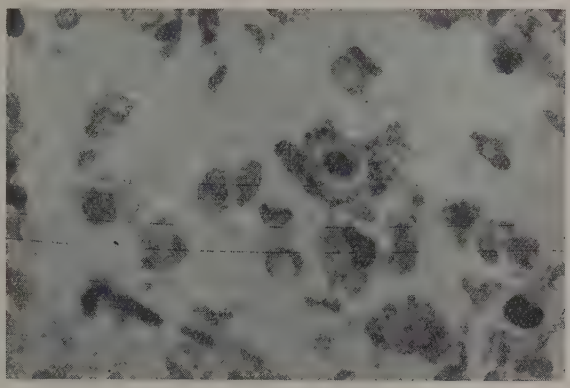


Fig. 5. — Rate de hamster (section). Capillaire sinusoïde considérablement dilaté contenant des cellules réticulaires macrophagiques ayant englobé un grand nombre de leishmanias. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

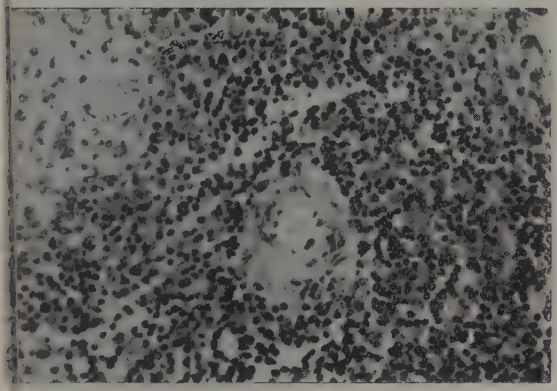


Fig. 6. — Rate de hamster (section) pendant la première phase de l'invasion parasitaire. Corpuscule de Malpighi: hyperplasie avec réaction réticulaire accentuée. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

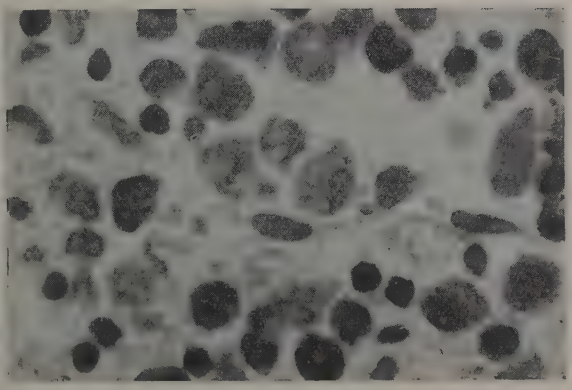


Fig. 7. — Moelle osseuse de hamster (section). Inhibition de maturation de la série granulocytaire (prédominance de myélocytes et promyélocytes) et quelques cellules réticulaires contenant des leishmanias. Microphotographie. Coloration hématoxyline-éosine Oc. 10, Ob. 90

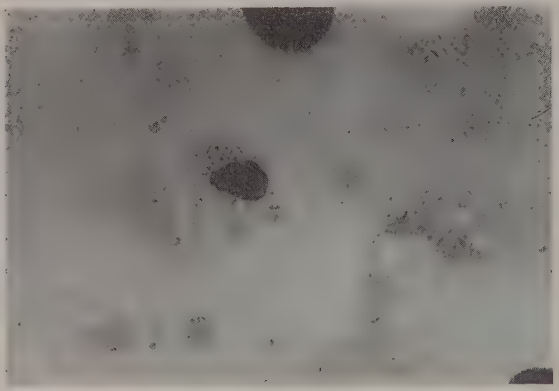


Fig. 8. — Lymphocyte à granulations toxiques. Empreinte de rate de hamster inoculé avec des leishmanias. Microphotographie. Coloration May-Grünwald-Giemsa Oc. 10, Ob. 90

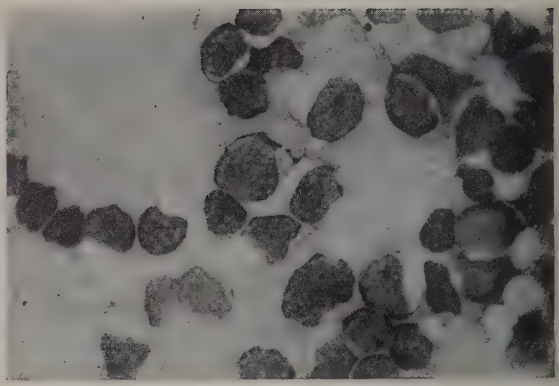


Fig. 9. — Réaction accentuée avec éléments de la série lymphoïde (formes jeunes et matures). Empreinte de rate de hamster inoculé avec une culture de leishmanias. Microphotographie. Coloration May-Grünwald-Giemsa Oc. 10, Ob. 90

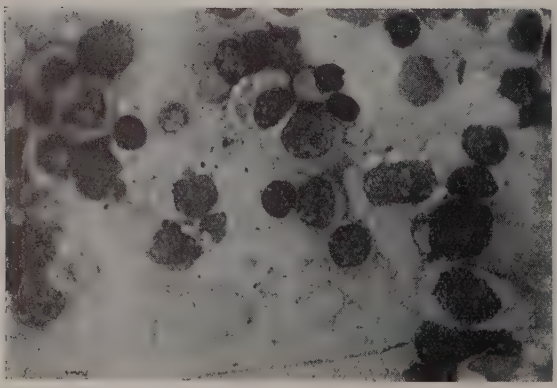


Fig. 10. Rate-empreinte d'un hamster inoculé avec de leishmanias. Cellules réticulaires plasmocytaires, certaines renfermant des vacuoles dans le cytoplasme. Cellule réticulaire macrophagique. Microphotrographie. Coloration May-Grünwald-Giemsa Oc. 10, Ob. 90

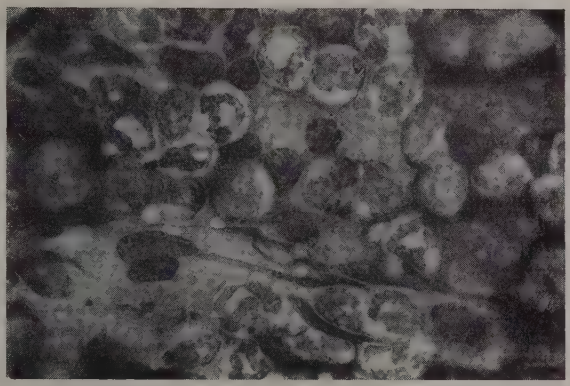


Fig. 11. — Frottis de moelle osseuse de hamster inoculé avec une culture de leishmanias (dix jours après l'inoculation). Hyperplasie de la série granulocytaire. Prédominance des éléments non-segmentés et segmentés. On aperçoit au centre une cellule réticulaire plasmocytaire. Microphotographie. Coloration May-Grünwald-Giemsa Oc. 10, Ob. 90

Les frottis et les ensemencements sur gélose du pus ganglionnaire mentionné ont montré la présence de cocci et de bacilles Gram-positifs. Pourtant, le même pus ensemencé sur le milieu NNN, additionné au préalable de pénicilline et streptomycine dans le liquide de condensation du milieu, a révélé — à notre surprise — une culture positive, relativement exubérante de flagellés leishmaniens.

Les études anatomo- et histopathologiques faites par divers auteurs, autant chez l'homme que dans l'infection expérimentale des animaux de laboratoire, ont montré et souligné que la leishmaniose viscérale évolue comme une réticulo-endothéliose typique, le processus pathologique étant caractérisé, par l'invasion parasitaire, surtout dans les éléments réticulo-endothélio-histiocytaires, et par la prolifération et l'hyperplasie cellulaire de ce système, où le parasite se multiplie ou bien est phagocyté.

Cette réaction cellulaire et tissulaire est particulièrement accentuée dans la rate et le foie, viscères riches en tissu réticulo-endothélio-histiocytaire.

Il est évident que les modifications histopathologiques produites par *L. donovani* chez le hamster doré sont essentiellement les mêmes que chez le hamster chinois.

Etant donné que l'étude de MELENEY, ainsi que les recherches similaires d'autres auteurs ont été faites exclusivement sur des sections de viscères, nous avons essayé d'établir une corrélation entre les données obtenues sur les sections et celles de l'étude cytomorphologique des empreintes d'organes, la dernière technique nous permettant d'observer les éventuelles modifications nucléaires et cytoplasmatiques dans leurs plus fins détails.

Nous avons considéré cette corrélation d'autant plus intéressante que, ainsi qu'il est mentionné par MELENEY, la réaction cellulaire réticulo-endothéliale semble précéder l'invasion parasitaire.

Les observations ont été faites sur 27 hamsters dorés.

Neuf de ces animaux provenaient du lot des 46 hamsters, inoculés par voie intrapéritonéale avec du broyage de rate et de foie provenant de hamsters infectés avec *L. donovani*. Les empreintes et les pièces pour l'examen histopathologique ont été prélevées immédiatement après la mort ou après avoir sacrifié les animaux.

La durée de l'évolution de l'infection chez ces 9 hamsters a été comprise entre 24 et 127 jours, le parasitisme massif, spécialement de la rate et du foie, étant observé, en général, à partir du 55-e jour de l'infection.

Le reste de 18 hamsters avait été inoculé de même par voie intrapéritonéale avec des cultures de flagellés leishmaniens sur milieu NNN et sacrifié le 10-e, 15-e, 45-e, 60-e et le 90-e jour. Six animaux ont été sacrifiés à des intervalles de temps beaucoup plus longs: 130, 240, 276, allant jusqu'à 309 jours.

Le parasitisme de ce lot d'animaux a été de beaucoup plus discret, décelable seulement après un long délai de temps à partir du moment de l'inoculation.

L'étude histopathologique entreprise par nous a comporté:

1. Prélèvements d'empreintes de la rate et du foie et des frottis de la mœlle osseuse fémurale, colorées ensuite par la méthode de May-Grünwald-Giemsa.

2. Prélèvements de pièces de la rate, du foie et de la mœlle osseuse, fixées dans le liquide Helly, et dont les sections ont été colorées à l'hématoxyline-éosine et par la méthode de Giemsa.

L'analyse morpho-pathologique des empreintes d'organes a permis d'observer deux aspects de réactivité réticulo-endothéliale:

I. *Le premier aspect* constaté au commencement de l'évolution de l'infection lorsque les éléments leishmaniens n'ont pu être mis en évidence ni sur les empreintes, ni sur les sections.

À ce stade on remarque:

Rate. Réaction modérée avec éléments réticulaires jeunes, non-différenciés (type Rohr), cellules lympho-réticulaires (Bessis), cellules réticulaires macrophagiques, plasmocytes adultes (plasmazellen Naegeli), un nombre élevé d'éléments de la série lymphoïde avec prédominance de lymphocytes adultes ou presque adultes (prolymphocytes du IIe degré de Kienle).

On observe également une proportion modérement accrue des éléments de la série granulocytaire — segmentés et non-segmentés. Certains de ces éléments présentent dans leur cytoplasme des granulations toxiques.

Foie. Un nombre légèrement augmenté de cellules Kupffer, de histiocytes, de lymphocytes et de plasmocytes adultes, ainsi que de rares polymorphonucléaires. Les éléments cellulaires hépatiques ne présentent pas des altérations; par place on observe des noyaux hypertrophiques et un nombre élevé de mitoses.

Moelle osseuse. Réaction modérée des éléments réticulaires jeunes non-différenciés (type Rohr), des cellules réticulaires contenant de nombreuses et grandes granulations azurophiles (Ferrata), de rares cellules réticulaires monocytoïdes et plasmocytes, un nombre relativement réduit de lymphocytes et une légère réaction à élèments granulocytaires adultes.

II. *Le deuxième aspesct* réactif — considérablement plus accentué et polymorphe — a été celui constaté chez les animaux inoculés avec du broyage de rate et de foie, chez lesquels, en partant du 24-e jour de l'inoculation, on a constaté un nombre assez élevé de parasites tant sur les empreintes, que sur les sections.

Le même aspect réactif a été constaté chez les animaux du lot inoculé avec les cultures. Chez ces animaux l'évolution clinique a été beaucoup plus longue,

les empreintes de la rate, du foie et de mœlle osseuse présentant seulement de rares éléments leishmaniens.

Ce fait est en concordance avec l'observation de CUSHING et CAMPBELL (1957) dans le sens que les modifications réactives des éléments réticulo-endothélio-mésenchymaux sont d'autant plus accentuées que l'induction antigénique — dans ce cas de nature parasitaire — est plus prolongée.

Chez les animaux de ce groupe l'examen cyto-morphologique des empreintes montre:

Rate. Une réaction accentuée à éléments réticulaires jeunes, non-différenciés, qui possèdent parfois un cytoplasme basophile et un contour flou. On constate également une grande fréquence des éléments lympho-réticulaires (Bessis) du type décrit plus haut. Comme aspect particulier, on observe dans le cytoplasme un nombre important de ces cellules, la présence de granulations azurophiles, rondes, à halo périgranulaire nettement délimité. On remarque de même toute une gamme d'éléments lympho-réticulaires à grandes granulations azurophiles irritatives, allant de l'élément jeune précurseur, jusqu'au lymphocyte adulte avec tachychromasie et masse nucléaire compacte, typique.

Des cellules réticulo-monocytaires et riederiformes, ainsi que des macrophages qui ont englobé soit des leishmania, soit des débris nucléaires ou des érythrocytes, se trouvent aussi en grand nombre.

Dans de nombreux cas, on a observé une réaction très accentuée avec cellules éndothéliales de capillaires sinusoïdes, formant quelquefois de vraies plages endothéliales, ainsi que des éléments réticulaires plasmocytaires.

La proportion des éléments de la série granulocytaire a été, en général, réduite.

Les éléments de la série rouge, diminués dans les cas à invasion leishmanienne massive, présentent par contre une évidente réaction dans les cas où le parasitisme est faible ou modéré.

Foie. Une prolifération accentuée des éléments de Kupffer, de grandes taille, à noyau en réseau fin et un cytoplasme abondant, contenant souvent un nombre variable de leishmania (de 2—3 jusqu'à 20—30 éléments dans une seule cellule).

On observe de même des histiocytes à noyau spongieux avec des nucléoles clairs et un cytoplasme bleu-clair réduit, dans certains cas, à une bande autour du noyau, abondant dans d'autres cas et contenant des éléments leishmaniens.

On constate, parmi les éléments de Kupffer et les histiocytes, un nombre élevé de plasmocytes adultes, ainsi que des cellules réticulaires plasmocytaires (formes précurseurs type Fagraeus) avec discordance nucléocytoplasmique, présentant un réseau chromatinien relativement dense, mais avec des nucléoles clairs et un cytoplasme abondant basophile (moins intense que chez le plasmocyte adulte). Dans le cytoplasme de ces éléments on trouve, dans certains cas, des masses azurophiles de dimensions variables (corps Russel) occupant parfois l'entière masse cytoplasmique (Flammenplasmozyt).

A part ces éléments cellulaires plasmatiques on rencontre fréquemment des lymphocytes adultes ou jeunes, ainsi que des cellules lympho-réticulaires à noyau en bande (cellules en drapeau) contenant des noyaux clairs, ovalaires ou allongés.

Dans peu de cas on constate également une réaction, en général modérée, de la série granulocytaire.

Les éléments cellulaires parenchymateux des cordons de Remak présentent de nombreux noyaux hypertrophiques ou de condensation chromatinienne, allant jusqu'à la pycnose et la vacuolisation du cytoplasme.

Moelle osseuse. L'examen des frottis a révélé trois caractères principaux qui — à notre opinion — pourraient expliquer la pathogénie de l'anémie et de la leucopénie dans la leishmaniose viscérale:

1. Réaction réticulaire intense, constante avec un accentué polymorphisme cellulaire;
2. Inhibition de la maturation de la série granulocytaire;
3. Régénération diminuée de la série rouge.

1. *La réaction réticulaire* est réalisée, en premier lieu, au dépens des éléments cellulaires jeunes, non-différenciés, qui peuvent présenter deux aspects irritatifs:

a) des éléments cellulaires à cytoplasme basophile;

b) des éléments cellulaires à vacuolisation nucléaire et cytoplasmique.

A remarquer en même temps la fréquence des cellules réticulaires macrophagiques, contenant soit des éléments leishmaniens, soit des érythrocytes, les aspects d'érythrophagie étant ici plus fréquemment rencontrés que dans la rate.

Dans la grande majorité des cas, on a constaté aussi un nombre considérablement élevé d'éléments réticulaires Ferrata, un nombre modéré de cellules réticulaires monocytoïdes, des cellules riederiformes, relativement rares, et de grandes cellules contenant parfois des corps Russel.

Les cellules lympho-réticulaires sont beaucoup plus rarement rencontrées dans la moelle que dans les empreintes de la rate et du foie.

2. *L'inhibition de maturation de la série granulocytaire* est constante et évidente.

Les champs microscopiques sont dominés par des éléments myélocytaires et promyélocytaires volumineux, contenant très souvent de grandes granulations irritatives, toxiques.

Dans deux cas seulement on a constaté une réaction modérée des éléments granulocytaires éosinophiles.

3. *La régénération de la série rouge* est diminuée dans son ensemble, les éléments de cette série occupant une place restreinte dans le myélogramme.

Les modifications histopathologiques déterminées par l'infection expérimentale avec *L. donovani* chez le hamster doré, étudiées sur sections, sont similaires à celles décrites par Meleney (1925) chez le hamster chinois.

Ces modifications présentent des degrés variables d'intensité par rapport au stade de l'infection.

Pendant le stade initial, lorsque le parasite n'est pas encore décelable, on remarque:

Rate. Hyperémie accentuée accompagnée de l'hyperplasie des éléments réticulaires et endothéliaux de capillaires sinusoïdes (cellules réticulo-endothéliales « réactives ») ainsi que l'hypertrophie des corpuscules de Malpighi et des manchons lymphoïdes périvasculaires.

Parmi les éléments de la pulpe rouge, on constate également un nombre accrû d'éléments plasmocytaires.

Dans les *stades avancés de l'infection*, l'hyperémie est beaucoup plus accentuée et la réaction réticulo-endothéliale considérablement augmentée.

Cet aspect réactif intense de la pulpe rouge est accompagné par une atrophie assez accentuée des corpuscules de Malpighi, ainsi que des manchons lymphoïdes périvasculaires.

La fréquence des éléments plasmocytaires est très grande, présentant souvent l'aspect de véritables nids.

Chez les animaux intensivement parasités, on constate, surtout dans la pulpe rouge, une série d'éléments cellulaires, tels que:

1. Cellules réticulaires grandes à noyau volumineux, avec chromatine, en réseau fin et cytoplasme abondant, souvent flou, contenant 2—3—50 éléments leishmaniens.

2. Cellules réticulaires grandes (25—35 μ) à noyau volumineux rond, plus rarement ovalaire, avec réseau chromatinien fin, nucléoles multiples et cytoplasme abondant, pâle, à contour nettement délimité (cellule réticulaire réactive ou « activée » selon MARSHALL et WHITE).

3. Cellules endothéliales des capillaires sinusoïdes, de grandes dimensions (25—30 μ) avec réseau chromatinien fin, cytoplasme abondant, contenant 2—3 ou plusieurs corpuscules leishmaniens.

4. Cellules endothéliales sinusoïdales, modérément hypertrophiées, avec un noyau ovalaire et tuméfié et un cytoplasme allongé, abondant et faiblement coloré (cellule endothéliale « réactive »).

5. Cellules macrophagiques ayant incorporé des débris de noyaux, ainsi que des érythrocytes.

6. Cellules réticulaires plasmocytaires isolées ou groupées.

Outre ces éléments cellulaires qui dominent les champs microscopiques, on rencontre des cellules réticulaires et endothéliales d'aspect et structure, en général, normal, mais présentant certaines modifications structurales, constituant — dans leur ensemble — toute une gamme d'aspects cytomorphologiques allant jusqu'au types « réactifs » décrits plus haut.

Dans la *pulpe blanche* de la rate, le nombre des éléments lymphoïdes adultes (lymphocytes) ou en voie de maturation (prolymphocytes) est réduit.

Le centre germinatif est considérablement hypertrophié et contient des éléments réticulaires ou lympho-réticulaires.

Cet aspect structural est en parfait accord avec les images obtenues sur les préparations-empreintes où les éléments réticulo-endothéliaux et lymphoïdo-réticulaires prédominent constamment.

Les manchons lymphoïdes périvasculaires sont très réduits dans la plupart des cas, se limitant à une seule rangée d'éléments lymphoïdes adultes, ou même faisant défaut.

On observe rarement des éléments lymphoïdes ayant phagocyté des corpuscules leishmaniens.

La capsule splénique est modérément épaissie.

Foie. Les modifications histopathologiques du foie, peu évidentes au début de l'infection, s'intensifient progressivement, en affectant particulièrement les capillaires sinusoïdes. Elles sont caractérisées par une congestion accentuée, une importante prolifération et hypertrophie des éléments cellulaires de Kupffer.

On distingue deux catégories de modifications par rapport à la durée de l'infection:

1. Chez les animaux sacrifiés pendant la phase initiale de l'infection, lorsque les parasites ne sont pas encore décelables sur les sections ou empreintes, les modifications histopathologiques sont caractérisées par:

a) une hyperplasie modérée des cellules de Kupffer dans certains cas et assez accentuée dans d'autres. A part les cellules de Kupffer, normales comme dimensions et structure nucléocytoplasmique, on observe assez souvent de grandes cellules à noyau volumineux, avec un réseau chromatinien fin, ainsi qu'un cytoplasme abondant;

b) une vasodilatation modérée des capillaires sinusoïdes;

c) une réaction modérée avec histiocytes, lymphocytes et plasmocytes, dans l'espace de Kiernan et extrêmement rare dans l'espace périlobulaire;

d) dans les cordons hépatiques on n'observe que très rarement des noyaux hypertrophiques et des mitoses.

2. Le second groupe, présentant une évolution plus longue et une intensité parasitaire variable, mais constante, permet d'observer:

a) une hyperplasie réticulo-endothéliale accentuée avec prolifération surtout des grands éléments de Kupffer, avec un noyau volumineux et un cytoplasme abondant, qui proémine souvent dans l'intérieur du vaisseau;

b) une vasodilatation accentuée, tant des capillaires sinusoïdes que des veines centrolobulaires;

c) une prolifération accentuée des éléments histiocytaires lymphoïdes et plasmocytaires de l'espace de Kiernan;

d) la présence de petits infiltrats avec lymphocytes ou plasmocytes entre les cordons des cellules hépatiques;

e) des formes hypertrophiques à noyaux volumineux, condensations chromatiniennes et même des pycnoses nucléaires parmi les éléments cellulaires des cordons de Remak;

f) des altérations cytoplasmatiques caractérisées par des vacuolisations prédominant autour de la veine centrolobulaire et plus rarement de la veine périportale. On remarque parfois même l'atrophie des cordons cellulaires de Remak;

g) la présence de corpuscules *L. donovani* dans les cellules parenchymateuses hépatiques;

h) réaction accentuée dans les espaces porto-biliaires, avec des mononucléaires, de rares polymorphonucléaires, de fréquents histiocytes, ainsi que des plasmocytes isolés ou groupés. Les histiocytes sont en réaction active, avec un grand noyau et un réseau chromatinien laxe, le cytoplasme abondant contenant souvent des éléments leishmaniens tant au niveau des espaces porto-biliaires, que dans l'espace souscapsulaire de l'organe;

i) des îlots de cellules lymphoïdes, plasmocytes et histiocytes, parmi les cordons cellulaires hépatiques. Ces infiltrations sont parfois tellement intenses, qu'elles modifient même l'architecture trabéculaire hépatique;

j) les veines centrolobulaires sont souvent dilatées et gorgées de sang.

Dans la *moelle osseuse* le tableau histopathologique est en rapport, ainsi que celui de la rate et du foie, avec le stade de l'infection, les altérations étant similaires à celles décrites sur les préparations-empreintes.

Ainsi, pendant la phase initiale, la mœlle osseuse est hyperplastique, avec réaction réticulaire modérée et hyperplasie des éléments de la série granulocytaire.

On rencontre de même de fréquentes cellules plasmatiques.

La série rouge est modérément réactive, avec des éléments en voie de maturation (érythroblastes polychromatophiles et ortochromatiques).

Les stades avancés de l'infection sont caractérisés par:

a) mœlle osseuse hyperplastique où la prolifération cellulaire intéresse, avec prédominance, les éléments de la série réticulaire ainsi que ceux de la série granulocytaire; on constate en même temps un nombre relativement élevé de mégacaryocytes;

b) inhibition de maturation de la série granulocytaire (prédominance de promyélocytes et myélocytes);

c) régénération diminuée de la série érythrocytaire (la diminution du nombre des éléments nucléés érythrocytaires de l'entière série rouge).

RÉSUMÉ

Dans le present travail on décrit les observations effectuées sur un lot de hamsters, pendant plus de 3 années, en ce qui concerne la pathogénité et l'évolution de l'infection à *L. donovani* chez le hamster doré *(Cricetus auratus)*.

On y relate les descriptions détaillées des modifications cyto-morphologiques constatées sur les empreintes de rate, foie et mœlle osseuse chez 27 hamsters dorés, mises en corrélation avec les modifications histopathologiques constatées sur les sections des mêmes viscères.

BIBLIOGRAPHIE

Adler S. — Acta Med. Orientalia, 1947, **6,** 151.
Alexeev G. I. et Glebovici O. V. — Klin. Med., 1952, **30,** 68.
Alpert M. — Endrocrinology, 1950, **46,** 166.
Bessis M. — Traité de cytologie, Paris, 1954.
Chung Huei-Lan. — Chin. Med. J., 1953, no. 6, 421.
Cushing J. E. et Campbell D. H. — Principles of Immunology, New-York, 1957.
Faqraeus A. — Acta Haematologica, 1958, **20,** 8.
Gellhorn A., Van Dyke H. B., Pyles W. J. et Tupikova N. A. — Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1946, **61,** 25.
Giraud P. — Rev. int. Hépatol., 1956, **5,** 769.
Goodwin L. G. — Nature, 1945, **156,** 476.
Guasch J. — Rev. Path. gén. Physiol. Clin., 1956, **56,** 151.
Harrison C. V. et Fulton J. D. — Brit. J. Exper. Path., 1946, **27,** 4.
Laveran A. — Leishmanioses, Ed. Masson, Paris, 1917.
Meleney H. E. — Amer. J. Path., 1925, **1,** 147.
Ritterson A. L. — J. of Parasit., 1955, **41,** 603.
Rohr K. — Das menschliche Knochenmarke, G. Thieme, Stuttgart 1960.
Sayers G. — Physiol. Rev., 1950, **30,** 241.
Schermer S. — Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere, Leipzig, 1954.
Sen Gupta P. C., Chakravarty N. K., Ray H. N. et das gupta B. — Amer. Trop. Med. and Parasit., 1956, **50,** 352.
Young C. W., Smyly H. I. et Brown C. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1924, **21,** 357.

К ВОПРОСУ О ПАТОГЕННОСТИ И ПАТОГИСТОЛОГИИ ИНФЕКЦИИ ВЫЗЫВАЕМОЙ *LEISHMANIA DONOVANI* У ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯКОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы излагают результаты наблюдений осуществленных на группе в 46 животрых в течение свыше 3-х лет в связи с патогенезом и развитием инфекции, вызываемой *L. Donovani* у золотистых хомяков *Cricetus auratus)*

После этого подробно излагаются цитоморфологические изменения, установленные при изучении препаратов-отпечатков селезенки, печени и костного мозга у 27 золотистых хомяков. Эти результаты сравниваются с патогистологическими изменениями, установленными при исследовании срезов, полученных из тех же органов.

BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER PATHOGENITÄT UND DER HISTOPATHOLOGIE DER INFEKTION MIT *LEISHMANIA DONOVANI* BEIM GOLDHAMSTER

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die an 46 während einer Zeitspanne von über 3 Jahren unter Beobachtung gehaltenen Tieren, über die Pathogenität und den Verlauf der Infektion mit *L. donovani* beim Goldhamster *(Cricetus auratus)* gemachten Feststellungen beschrieben.

Anschliessend werden die durch Untersuchung von Abdruckpräparaten aus der Milz, der Leber und dem Knochenmark von 27 Goldhamstern festgestellten zytomorphologischen Veränderungen eingehend beschrieben und mit den sich aus der Untersuchung von Schnittpräparaten der gleichen Organe ergebenden histopathologischen Veränderungen verglichen.

CONTRIBUTIONS TO A STUDY OF PATHOGENICITY AND HISTOPATHOLOGY IN INFECTION OF THE SYRIAN HAMSTER WITH *LEISHMANIA DONOVANI*

SUMMARY

The observation made in a group of 46 animals as regards the pathogenicity and course of infection with *L. donovani* in the Syrian hamster *(Cricetus auratus)* are reported. The animals were kept under observation for a period of over three years. The cytomorphological changes recorded by examination of prints from the spleen, liver, and bone marrow in 27 Syrian hamsters are described in detail and related to the histopathological changes found upon examination of sections of the same organs.

LA VARIABILITÉ DU STAPHYLOCOQUE DORÉ SOUS L'INFLUENCE DES POLYNUCLÉAIRES DU COBAYE

par

I. Mesrobeanu, Ştefania Ţaga, Ecaterina Alexenco et D. Stavri

(Travail de la Chaire de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Bucarest et de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section de Physiologie Microbienne)

— Manuscrit reçu le 26 juillet 1961 —

INTRODUCTION

Les recherches concernant la variabilité du staphylocoque doré, sous l'influence de diverses conditions de culture, sont nombreuses dans la littérature; l'ensemble des résultats démontrent que cette espèce, et particulièrement les souches dorées et blanches, sont susceptibles de générer des variantes non seulement avec la pigmentation changée, mais aussi avec de profondes modifications métaboliques, de pathogénité, antigéniques et de sensibilité vis-à-vis des antibiotiques.

Les méthodes qui permettent d'obtenir de telles variantes de staphylocoques sont généralement effectuées par l'incorporation aux milieux de culture des substances nocives en dilution sous-léthale et ensuite par l'isolement des mutantes stables. On peut également isoler à partir de vieilles cultures des variantes à pigmentation changée, dans lesquelles, les produits du métabolisme jouent certainement le rôle de facteurs d'induction des variantes microbiennes.

On trouve également dans la littérature une série d'observations qui démontrent qu'on peut obtenir des mutantes de staphylocoque en cultivant ce germe soit « in vivo », soit sur des organes isolés ou dans des extraits d'organes. Ainsi, Ştini et coll. (1945), en cultivant le staphylocoque doré sur des milieux contenant des extraits de rate, foie, reins, cerveau, ont obtenu des variantes blanches. Plus récemment, Kukulska-Goscicka, Michna-Bednarek et Zablocki (1959) ont décrit l'apparition de variantes avec pigmentation changée, en cultivant des staphylocoques sur des organes de souris. Ces variantes présentent un métabolisme modifié en comparaison avec la souche dont elles dérivent. Les modifications profondes, apparues chez certaines variantes se reflètent, non-seulement par la perte de l'équipement toxigène (coagulase, α-hémolysine, nécrotoxine), mais aussi par une sensibilisation aux antibiotiques des souches résistantes.

Cohn et coll. (1959) ont, du reste, exprimé clairement leur conviction que les méthodes d'induction de la variabilité « in vivo », quoique plus difficilement réalisables et plus complexes comme mécanisme, reproduisent plus fidèlement les phénomènes naturels.

De l'ensemble des recherches concernant l'interaction entre les staphylocoques et le macroorganisme, il ressort que ce germe est capable, dans ce conflit, de modifier une série de ses caractères physiologiques, biochimiques, de pathogénité et morphologiques, sans doute pour mieux résister à l'action nocive des humeurs et des tissus.

Mesrobeanu I. et coll. (1957), étudiant l'action des leucocytes sur les variantes pigmentogènes des staphylocoques, ont confirmé les expériences antérieures de Rogers et Thompset (1952), selon lesquels les variantes pathogènes peuvent survivre à l'intérieur des leucocytes, tandis que celles saprophytes sont détruites rapidement.

Par des recherches antérieures, nous avons démontré que les extraits acides leucocytaires ont des propriétés bactéricides vis-à-vis des staphylocoques et que ce pouvoir léthal varie selon la souche pigmentogène sur laquelle il agit. Ainsi, une suspension de staphylocoque doré est très peu lysée par l'extrait leucocytaire dans l'intervalle de 24 heures, tandis que la suspension de staphylocoque blanc est stérilisée en 120 minutes et celle de la variante citrine après 60 minutes de contact. On a également constaté que des variantes pénicillino-résistantes, qui ont subi des changements pigmentogènes acquérant en même temps le caractère de résistance, sont devenues sensibles à l'action bactéricide des humeurs de l'organisme (lysozyme, extrait acide leucocytaire), ce phénomène concernant surtout les mutantes blanches et citrines.

Dans ce mémoire, nous présentons les études effectuées sur différentes souches de staphylocoques dorés qui ont subi un contact avec les polynucléaires des cobayes « in vivo ». Nous avons étudié la variation de la production de diverses toxines, de la sensibilité aux antibiotiques, du type phagique et de la léthalité de ces souches pour le cobaye.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Préparation de l'exsudat péritonéal. On a utilisé des cobayes de 300 g auxquels on a inoculé i.p. en deux reprises, à deux heures d'intervalle, 20 ml de bouillon de culture chauffé à 37°C. Deux heures après la dernière injection on constate, par ponction, que l'exsudat péritonéal contient des polynucléaires en proportion d'environ $90^0/_{00}$

Les souches de staphylocoque utilisées ont été isolées de cas graves de furonculose et ont été notées: « 22 », « 23 », « 24 », « 25 » et « N ». Ces souches ont été étudiées du point de vue type phagique, sensibilité aux antibiotiques (pénicilline, streptomycine, auréomycine et chlorocide), ainsi que par les tests courants de pathogénéité « in vitro ».

Dans tous nos essais nous avons utilisé comme témoins deux souches: le *B. subtilis—Oxford* et le colibacille $O_{55}B_5$.

Toutes les cultures ont été réalisées dans du bouillon ordinaire, maintenues pendant 16 heures à 37°.

Le modèle expérimental utilisé a été le suivant: deux heures après la dernière inoculation du bouillon de culture on a introduit dans le péritoine du cobaye 2 ml de la culture du staphylocoque étudié. Après un certain nombre de tâtonnements, nous sommes arrivés à la conclusion que le moment le plus favorable pour une phagocytose maximum, quand on ne trouve plus sur les frottis de

rmes extracellulaires, se situe entre 18—20 heures après l'inoculation i.p. de culture. Dans presque tous les cas on trouve des germes intraleucocytaires. r conséquent, 18 heures après l'introduction des germes dans l'exsudat ritonéal on effectue des ponctions stériles avec une pipette Pasteur effilée, irant 3—4 ml d'exsudat, qui est mélangé à une solution d'héparine jusqu'à e dilution finale de $1^0/_{00}$. Les leucocytes sont lavés trois fois avec du sérum ysiologique par centrifugation trois minutes à 500 t/m. Après le dernier lavage surnageant est contrôlé, tant directement par des frottis colorés avec Gram, e par des ensemencements. Dans la majorité des cas, on constate que le liquide dépourvu de germes ou qu'il en est très pauvre. Le dernier sédiment leucocytre est repris dans 1 ml de sérum physiologique; cette suspension est coulée a surface de deux tubes de gélose ordinaire et ensemencée dans trois tubes ouillon. Après une incubation de 18 heures à 37°, on procède à des dispersions trois boîtes Petri avec gélose. Les colonies isolées, après 18 heures d'incution, sont étudiées du point de vue pigmentogenèse et caractères de ture.

Les colonies qui présentent des modifications visibles par comparaison à souche d'origine sont repiquées sur gélose et bouillon. Après 18 heures ncubation ces souches servaient d'une part à un nouveau passage « in vivo » ns l'exsudat péritonéal du cobaye et, d'autre part, à l'étude des caractères chimiques « in vitro ».

Dans le cas où les cobayes succombent, on effectue immédiatement des nocultures, les staphylocoques isolés servant aux passages ultérieurs.

Témoins. Pour nous rendre compte si par la téchnique utilisée on ne risque une surinfection avec d'autres staphylocoques, on a utilisé, dans toutes nos périences, des inoculations avec le *B. subtilis — Oxford* et le colibacille $O_{55}B_5$. germes étaient inoculés dans l'exsudat péritonéal des cobayes exactement ns les mêmes conditions que les staphylocoques. Dans toutes ces expériences us avons obtenu par ensemencement ultérieur seulement les germes inoculés dans aucun cas des cocci Gram-positifs.

Les variantes de staphylocoque obtenues dans nos expériences ainsi que les ches d'origine, ont été utilisées pour l'étude des caractéres suivants: pigment, gulase, fibrinolysine, alpha-hémolysine, fermentation du mannitol, léthalité r le cobaye, lysotypie, sensibilité à la pénicilline, streptomycine, auréocine, chlorocide et pour la production et le titrage de l'exotoxine.

RÉSULTATS

Dans une première série d'expériences nous avons utilisé les quatre souches staphylocoque doré, notées par: « 22 », « 23 », « 24 » et « 25 ». Les caractéiques de ces souches figurent dans le Tableau I.

Comme on le remarque de ce tableau, les souches sont toutes coagulaso-posis, sécrètent de la fibrinolysine et de l'alpha-hémolysine, fermentent le mannitol ont le type phagique 80/81. Par inoculation intrapéritonéale chez le cobaye, l d'une culture de 18 heures en bouillon ne tuent pas les animaux. L'antigramme, pratiqué d'après la méthodes des rondelles, montre que les souches t résistantes à 2 unités/rondelle de pénicilline, 100 gamma/rondelle de

Tableau I

Caractères des souches 22, 23, 24, 25

Souches initiales	Pigment	Coagulase	Fibrino-lysine	α-hémoly-sine	Mannitol	Lysotype	Léthalité cobaye	Antibiogramme			
								Pénicilline	Streptomyc.	Auréomyc.	Chloromyc.
22	doré	+	+	+	+	80/81	−	−	−	−	−
23	doré	+	+	+	+	80/81	−	−	−	−	−
24	doré	+	+	+	+	80/81	−	−	−	+	+
25	doré	+	+	+	+	80/81	-	−	−	+	+

Tableau II

Caractères des variantes obtenues par le passage des souches 22, 23, 24, 25 dans l'exsudat peritonéal

Souche	Variante	Pigment	Coagulase	Fibrinoly-sine	α-hémoly-sine	Mannitol	Lysotype	Léthalité cobaye	Antibiogramme			
									Pénicill.	Strept.	Auréomyc.	Chlorom.
22	22/1	modérément doré	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+
	22/2	doré	+	+	±	+	80/81	−	−	+	+	+
	22/3	blanc	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+
23	23/5	blanc	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+
24	24/1	blanc	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+
	24/2	doré	+	+	+	+	80/81	−	−	+	+	+
	24/3	blanc	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+
25		blanc	−	−	−	−	0	−	+	+	+	+

streptomycine et très peu sensibles à 10 gamma/rondelle d'auréomycine et 5 gamma/rondelle de chlorocide.

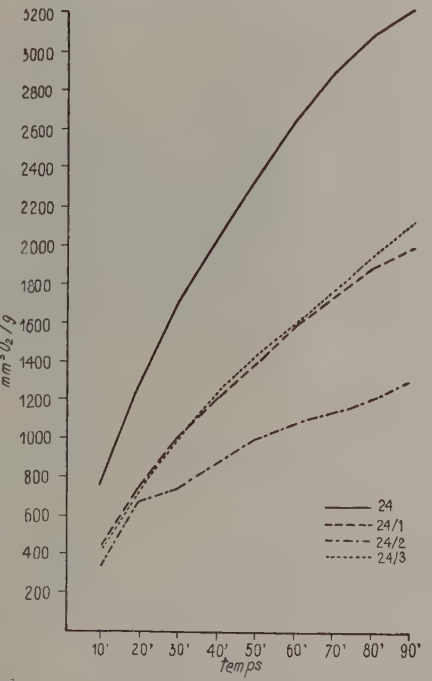
Souche 22. A partir du cinquième passage de cette souche dans le péritoine du cobaye (préparé avec exsudat leucocytaire) on obtient par dispersion, selon la technique décrite, des colonies qui présentent des modifications importantes par comparaison à la souche d'origine. Ainsi, nous avons étudié trois variantes isolées dans ce stade.

La variante 22/1 présente une dépigmentation partielle ; les tests de pathogénité « in vitro » sont devenus négatifs. En même temps, on remarque qu'elle n'est plus typable par le bactériophage et que, par surcroît, les germes sont devenus sensibles aux antibiotiques expérimentés.

Une autre variante, 22/2, présente une pigmentation dorée nette et les tests de pathogénité « in vitro » positifs ; elle est typable par le bactériophage, devenant sensible aux antibiotiques, à l'exception de la pénicilline.

La variante 22/3 présente une pigmentation blanche, très nette et les tests de pathogénité « in vitro » négatifs ; elle est non-typable par le bactériophage, devenant sensible à tous les antibiotiques expérimentés.

Ces variantes de même que la souche d'origine ne sont pas léthales pour les cobayes.



Graphique 1. — Consommation d'O_2, de la souche 24 et de ses variantes, en fonction du temps.

La souche 23 du staphylocoque doré a présenté au cinquième passage uniquement des variantes blanches avec tous les caractères changés et identiques à la variante no. 3 isolée à partir de la souche 22.

La souche 24 a donné une série de colonies avec des caractères modifiés, constituant dans cette série de recherches l'objet d'une analyse plus détaillée. Ainsi, les colonies 24/1 et 24/3 à pigmentation blanche ont présenté les tests de pathogénité négatifs, étant non-typables par le bactériophage et devenant sensibles aux antibiotiques, tandis que la colonie 24/2, à pigmentation dorée, a gardé les mêmes qualités biologiques que la souche d'origine, sauf en ce qui concerne la sensibilité à la streptomycine.

Ces souches ont été comparées entre elles en ce qui concerne leur intensité respiratoire. La consommation de l'O_2 en 90 minutes a été enregistrée à l'appareil Warburg, les résultats représentant la moyenne de plusieurs expériences. La

quantité d'O_2 consommée, exprimée en mm^3 O_2 par 1 g germes secs, a été la suivante:

Souche 24 dorée d'origine	32,5 mm^3 O_2
Variante 24/1 blanche	20 mm^3 O_2
Variante 24/3 blanche	21.4 mm^3 O_2
Variante 24/2 dorée	13.1 mm^3 O_2

La dynamique de la consommation d'O_2 en fonction du temps est figurée dans le graphique 1.

On remarque, en conséquence, que les variantes obtenues au cinquième passage dans l'exsudat péritonéal ont une respiration diminuée par rapport à la souche d'origine et que la variante 24/2, qui a gardé sa pigmentation initiale, ainsi que le reste des tests de pathogénité non-changés, présente néanmoins un taux respiratoire considérablement plus petit que le reste des variantes.

En étudiant également les protéines totales et les acides nucléiques de ces souches nous avons constaté que la variante 24/2 est similaire de ce point de vue à la souche d'origine, tandis que les variantes blanches, 24/1 et 24/3, sont identiques entre elles, mais diffèrent de la souche dont elles dérivent par la quantité plus diminuée de l'azote total, des protéines et des acides nucléiques (tableau no. III).

Tableau III

N total, protéines et acides nucléiques de la souche 24 et de ses variantes

		24 dorée	24/2 dorée	24/1 blanche	24/3 blanche
en % poids sec.	N total	12.1	12.4	11.3	11.06
	Protéines totales	60	61	51	57
	Acides nucléiques	8.6	9.2	6.5	7.6

Il ressort que les variantes qui sont venues en contact avec les polynucléaires et qui ont changé de pigmentation ont une constitution chimique différente de celle qui a gardé sa pigmentation initiale.

La souche 25. A partir du cinquième passage dans l'exsudat péritonéal on a isolé seulement des variantes blanches, avec les tests de pathogénéité « in vitro » négatifs, non-typables par le phage et sensibles aux antibiotiques (v. tableau II).

En conclusion, il ressort de cette série d'expériences, que les souches 22, 23, 24 et 25 de staphylocoque doré pathogène, après 5 passages successifs « in vivo » dans l'exsudat péritonéal avec polynucléaires, sont susceptibles de fournir des colonies qui ont perdu tous les caractères biochimiques utilisés comme tests de pathogénéité « in vitro », le type phagique et leur résistance aux antibiotiques.

Une autre série d'expériences a été réalisée avec la souche « N » de staphylocoque doré pathogène, dont les caractères biochimiques, figurant dans le tableau IV, sont similaires aux autres souches expérimentées.

Cette souche perd déjà à partir du deuxième passage dans l'exsudat péritonéal « in vivo » son type phagique; au sixième passage on constate aussi d'autres modifications, quoique les variantes obtenues aient gardé leur pigmentation dorée. Ainsi, à partir du septième passage la variante isolée est devenue également sensible à la pénicilline et à la streptomycine, quant le cobaye dans l'intervalle de 16 heures. En faisant un titrage de l'exotoxine, on constate que la souche d'origine, ainsi que ses variantes, présentent un titre similaire compris entre 1/200.000 — 1/10.000 DMH.

Après un mois de conservation dans le laboratoire la variante N/VII qui était léthale pour le cobaye, perd cette qualité, mais en faisant deux autres passages « in vivo » dans l'exsudat leucocytaire, on obtient de nouveau une souche léthale pour cet animal. Dans le tableau IV on peut observer que tous les caractères acquis par cette variante ont été fixés et que, par conservation à la température du laboratoire, ils n'ont pas varié. Ce fait prouve, en plus, que le « facteur léthal » pour le cobaye est pas l'exotoxine, celle-ci ne variant pas de taux chez les souches conservées, et qu'il faut un contact récent avec les polynucléaires pour que ce « facteur » se manifeste.

Après plusieurs mois de conservation à la température du laboratoire nous

Tableau IV

Caractères de la souche "N" et de ses variantes

Souche	Passages	Pigment	Coagulase	Fibrino-lysine	α-hémo-lysine	Mannitol	Lysotype	Léthalité cobaye	Titre DMH exotoxine	Antibiogramme			
										Pénicill.	Strept.	Auréom.	Chloro-cide
N		doré	+	+	+	+	80/81	—	1/200.000 1/100.000	—	—	+	+
N/VII	7	doré	+	+	+	+	0	†	1/200.000 1/100.000	+	+	+	+
N/VII/a	après un mois de conserv.	doré	+	+	+	+	0	—	1/200.000 1/100.000	+	+	+	+
N/VII/c	3	doré	+	+	+	+	0	†	1/200.000 1/100.000	+	+	+	+
N/12	12	doré	+	+	+	+	conc. 1/1000 80/81	†	1/200.000 1/100.000	—	—	+	+

Tableau V

Caractères de la souche 24 et de ses variantes

Souche	Passages	Pigment	Coagulase	Fibrino-lysine	α hémo-lysine	Mannitol	Lysotype	Léthalité cobaye	Titre DMH exotoxine	Antibiogramme			
										Pénicill.	Strept.	Auréom.	Chloro-cide
24	—	doré	+	+	+	+	80/81	—	1/200.000 1/100.000	—	—	+	+
24/VII	7	doré	+	+	+	+	0	†	1/200.000 1/100.000	+	+	+	+
24/VII/*a*	après un mois de conserv.	doré	+	+	+	+	0	—	0	+	+	+	+
24/VII/ blanche	2	blanc	—	—	—	—	0	†	0	+	+	+	+
24/VII/ dorée	2	doré	+	+	+	+	0	†	0	+	+	+	+

avons répété l'expérience avec la souche N d'origine, constatant les faits suivants: après 12 passages «in vivo» dans l'exsudat péritonéal la variante obtenue n'a plus présenté de modifications par rapport à la souche d'origine, sauf le fait qu'elle tuait le cobaye et qu'à partir du septième passage elle était typable par le bactériophage « 80 » seulement à la concentration de 1/1.000.

Enfin, une troisième série d'expériences a été entreprise avec la souche 24; les résultats sont figurés dans le tableau V.

A partir du septième passage, on constate que la variante 24/VII tue le cobaye quoiqu'elle ait gardé nonchangés le reste des caractères; elle devient toutefois insensible au bactériophage et acquiert la sensibilité à tous les antibiotiques utilisés.

Après un mois de conservation à la température du laboratoire, la variante 24/VII ne tue plus le cobaye, et comme dans le cas de la souche «N», deux passages dans l'exsudat péritonéal rétablit cette qualité. En faisant à ce moment une dispersion des colonies sur gélose, on obtient deux nouvelles variantes: une *24/VII blanche* qui tue le cobaye et qui a perdu tous les caractères de pathogénéité «in vitro» et une autre variante *24/VII dorée* qui est également léthale pour le cobaye, mais dont les tests de pathogénéité sont restés positifs.

On remarque du tableau V que les variantes issues de la souche 24/VII ne sont plus sensibles au bactériophage, ne produisent plus d'exotoxines et sont sensibles à l'action des antibiotiques utilisés.

Les expériences effectuées avec les souches témoins ont été pratiquées simultanément à nos essais avec les souches de staphylocoque et conformément au même modèle expérimental. Nos expériences ont démontré qu'il n'y a pas de possibilité de surinfection avec des staphylocoques. Au moment de l'apparition du « facteur léthal » chez nos variantes, nous avons toujours inoculé un certain nombre de témoins avec une quantité de bouillon stérile égale à la quantité de culture inoculée. Tous ces témoins ont survécu, tandis que les cobayes inoculés avec les variantes devenues léthales ont succombé en 16—20 heures.

DISCUSSION

Dans ce travail nous avons recherché l'influence « in vivo » des polynucléaires des cobayes sur la variabilité du staphylocoque doré. Dans ce but, nous avons établi un modèle expérimental qui nous a permis d'isoler à partir de la souche inoculée dans le péritoine du cobaye, préparé avec de l'exsudat leucocytaire, des germes intraleucocytaires.

Il est certain que, jusqu'au moment où les polynucléaires englobent les staphylocoques, les germes subissent l'action d'autres facteurs avec des propriétés bactéricides qui font partie des humeurs de l'organisme.

On constate déjà le début de la phagocytose 5 minutes après l'inoculation de la culture dans l'exsudat, qui atteint son maximum en 18—20 heures. Nous avons observé qu'après 18 heures on obtient un exsudat leucocytaire avec très peu de germes extra-cellulaires. Par centrifugation répétée on obtient des surnageants dans lesquels on ne trouve plus des germes ou avec de rares exceptions, seulement quelques individus. Par contre, en ensemençant le culot leucocytaire, on obtient des cultures abondantes, ce qui nous a permis de conclure que les variantes obtenues dans notre modèle expérimental ont subi le contact direct avec les leucocytes.

Les cultures effectuées à partir des leucocytes de l'exsudat, nous ont démontré que les staphylocoques peuvent survivre dans les polynucléaires 18 heures après l'inoculation, fait qui confirme les résultats de Cohn et de ses collaborateurs.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons obtenu à partir de 5 souches les staphylocoques dorés pathogènes, six variantes blanches qui ont présenté des modifications biochimiques profondes. Ainsi, les variantes blanches des souches 22, 23, 24, après le cinquième passage, à part le nouveau caractère pigmentogène acquis, ne présentent plus les tests de pathogénité « in vitro », sont devenues résistantes aux phages et perdent leur résistance aux antibiotiques. Le dernier fait confirme les travaux de Kukulska-Goscicka et coll. qui ont remarqué le même phénomène en cultivant les staphylocoques sur des organes de souris.

La perte des caractères de pathogénité chez certaines variantes de staphylocoques dorés a été souvent signalée dans la littérature (Hoffstadt et Youmans Joniece et coll., Mesrobeanu et coll., etc.).

En ce qui concerne l'importance du pigment comme indice de pathogénité il n'existe pas de concordance chez les divers auteurs. Ainsi, Mellon et Caldwell (1926) sont d'avis que les variantes blanches ont le pouvoir de sécréter le pigment doré; Pinner et Voldrich (1932) affirment que le phénomène de dissociation microbienne comporte seulement une modification du pigment, tandis que pour Boniece et coll. (1957) la couleur du pigment chez les staphylocoques ne constitue pas un caractère de pathogénité.

Dans nos expériences, le fait que nous avons pu isoler, à partir d'un certain nombre de passages dans les leucocytes « in vivo », des variantes qui tuent l'animal par septicémie et qu'aucune souche d'origine n'était capable de présenter ce phénomène, revêt une importance particulière.

D'après nos recherches toutes les variantes dorées, léthales pour le cobaye, ont donné les tests de pathogénité « in vitro » positifs; elles perdent leur sensibilité vis-à-vis du phage, deviennent sensibles aux antibiotiques et sécrètent de l'exotoxine au même titre que la variante d'origine non-léthale. Il ressort que le « facteur léthal » pour le cobaye, acquis par le germe en contact avec les polynucléaires, est différent de l'exotoxine. Comme nous allons le démontrer dans un prochain travail, les souches qui tuent le cobaye par septicémie ont acquis une capsule, ce qui explique leur pouvoir envahissant et leur résistance à la phagocytose.

CONCLUSIONS

Les staphylocoques dorés, soumis à l'influence « in vivo » des leucocytes polynucléaires de cobaye présentent des variations. On a établi un modèle expérimental, par lequel le staphylocoque est maintenu en contact prolongé dans l'intérieur du phagocyte. Ces conditions permettent d'obtenir des variantes de staphylocoque présentant de nouveaux caractères biochimiques, pigmentogènes, de pathogénité et de comportement envers le bactériophage et les antibiotiques. Chez certaines variantes apparaissent également de nouveaux caractères de léthalité, provoquant la mort des cobayes par septicémie.

BIBLIOGRAPHIE

1. Boniece W. S., Wick W. E. et Holmes D. H. — J. Bact., 1957, **73,** 685
2. Cohn Z. A., et Moise S. S. — J. Exp. Med., 1959, **3,** 419
3. Hoffstadt R. E. et Youmans G. P. — J. Bact., 1934, **27,** 551
4. Kukulska-Goscicka T., Michna-Bednarek Z. et Zablocki, B.: Bull. — Ac. Polonaise Sci., 1959, **7,** 504
5. Mellon R. R. et Caldwell D. W. — J. Bact., 1926, **12,** 409
6. Mesrobeanu I., Mesrobeanu L., Mitrica N. et Papazian E. — Minerva Medica, 1957, **48,** 1375
7. Mesrobeanu L., Mitrica N. et Rădulescu E. — St. şi Cercet. Inframic., 1952, **3,** 129
8. Nutini L. G., Kreke C. W. et Schroeder M. — J. Bact., 1945, **50,** 177
9. Pinner M. et Voldrich M. — J. Infect. Dis., 1932, **50,** 185
10. Rogers D. E. et Thompsett R. — Bull. N. Y. Acad. Med., 1952, **28,** 470

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ СЕГМЕНТОЯДЕРНЫХ ЛЕЙКЦИТОВ МОРСКОЙ СВИНКИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

У золотистых стафилококков наблюдаются изменения, если они подвергаются *in vivo* влиянию сегментоядерных лейкоцитов морской свинки. Авторам удалось получить экспериментальную модель, при помощи которой стафилококк находится продолжительное время внутри фагоцита. В этих условиях были получены варианты стафилококков, обладающие новыми биохимическими, пигментогенными, патогенными свойствами, различным поведением в отношении бактериофага и антибиотиков. У некоторых вариантов отмечается появление новых признаков, вызывающих смертность морских свинок в результате септицемии.

DIE VARIABILITÄT DES *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* UNTER DEM EINFLUSS POLYMORPHKERNIGER MEERSCHWEINCHENLEUKOZYTEN

ZUSAMMENFASSUNG

Bei *Staphylococcus aureus* treten Variationen auf, wenn die Keime dem Einfluss polymorphkerniger Meerschweinchenleukozyten *in vivo* ausgesetzt werden. Es wurde eine Versuchsanordnung erdacht, bei der die Staphylokokken längere Zeit im Inneren der Phagozyten in Kontakt gehalten werden. Unter diesen Umständen können Staphylokokkenvarianten mit neuen Merkmalen (Biochemie, Pigmentbildung, Pathogenität, Verhalten gegenüber Bakteriophagen und Antibiotika) erhalten werden. Bei einigen Varianten treten neue Merkmale hinsichtlich der Fähigkeit beim Meerschweinchen eine tödliche Septikämie hervorzurufen auf.

VARIABILITY OF *STAPHLOCOCCUS AUREUS* UNDER THE INFLUENCE OF GUINEA-PIG POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

SUMMARY

Staphylococcus aureus displays variations when subjected to the *in vivo* influence of guinea-pig polymorphonuclear leukocytes. An experimental method has been devised by means of which the staphylococci are maintained in contact for a longer period whithin the phagocyte. Staphylococcal variants displaying new biochemical, pigment-forming, and pathogenic characters, and an altered behaviour towards bacteriophages and antibiotics may be obtained under these circumstances. In some variants new characters appear as regards the lethality due to septicaemia in guinea-pigs.

FORMATIONS CAPSULAIRES CHEZ LES VARIANTES DES STAPHYLOCOQUES SOUMIS A L'INFLUENCE DES LEUCOCYTES « IN VIVO »

par

I. Mesrobeanu et Ştefania Ţaga

(Travail de la Chaire de Microbiologie de l'Institut Médico-Pharmaceutique de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 26 juillet 1961 —

Dans un travail antérieur on a pu démontrer (1), par l'utilisation d'un modèle expérimental « in vivo », la possibilité d'obtenir des variantes de staphylocoque doré, possédant des caractères léthaux pour le cobaye.

Dans le présent travail sont décrites des expériences qui démontrent que ces variantes de stapylocoque doré peuvent acquérir de nouvelles propriétés de pathogénité sous l'action des leucocytes polynucléaires du cobaye.

MÉTHODES ET RÉSULTATS

Le modèle expérimental utilisé a été décrit dans un travail précédent (1). Les souches d'origine de staphylocoque doré utilisées dans la présente étude ont été dénommées les souches «24» et «N» avec leurs variantes respectives «24/VII» doré», «N/VII» et «N/12».

Les souches d'origine 24 et N présentaient les suivants caractères positifs de pathogénité « in vitro»: les tests coagulase, fibrinolysine, α-hémolysine, pigment doré et fermentation du mannitol; elles étaient résistantes à la pénicilline et à la streptomycine et avaient le type bactériophagique 80/81. Les titrages le l'exotoxine produite par ces souches ont donné un titre variant entre 1/20.000—1/100.000 DMH. Les germes (dose: 0,2 ml de culture de 18 heures en bouillon), inoculés dans le péritoine du cobaye, présentant un exsudat provoqué par l'introduction de bouillon stérile, ne tuaient pas l'animal.

Les variantes 24/VII dorée et N/VII, après 7 passages et la variante N/12 après 12 passages dans l'exsudat leucocytaire du péritoine du cobaye, présentaient les caractères suivants: les tests de pathogénité « in vitro » étaient identiques à la souche d'origine et produisaient la même quantité d'exotoxine, mais, par opposition aux souches initiales, ces variantes étaient sensibles à la pénicilline et à la streptomycine et étaient devenues non-typables par le bactériophage. De même, tandis que les souches d'origine étaient non-léthales pour les cobayes, ces variantes, qui avaient préalablement subi un contact avec les leucocytes, tuaient les animaux en 18—24 heures, par septicémie. Aux examens bactério-

logiques des cobayes morts, les hémocultures étaient positives et les frottis de l'exsudat péritonéal montraient des staphylocoques tant intra- qu'extra cellulaires.

Les souches, dont les propriétés pathogènes présentaient les variations décrites plus haut ont été conservées deux mois sur gélose, à la température du laboratoire. Après ce laps de temps, injectées dans le péritoine cobayes, elles ne tuaient plus le cobaye, le caractère de pathogénité se manifestant de nouveau après un à trois passages négatifs sur l'animal et se maintenant ensuite constant.

Cette variation de la pathogénité nous a suggéré l'idée de l'existence d'un nouveau facteur de résistance du germe, acquis sous l'influence directe du leucocyte polynucléaire du cobaye. En effet, c'était la présence d'une formation capsulaire qui constituait ce nouveau facteur de résistance. On a tâché de prouver la présence de cette formation capsulaire par différentes méthodes, soit par la coloration de la capsule sur les frottis, soit par l'observation directe au microscope avec contraste de phase ou au microscope de contraste « chromo-anoptral » (d'après C. I. Ciurea et coll.).

Les différentes méthodes employées pour la coloration de la capsule — de Muir (fuxine phéniquée, mordant de Muir et bleu Loeffler), de Hiss (fuxine basique et sulfate de cuivre), de Lyons (collargol, fuxine Ziehl, hydroxide de sodium et bleu Loeffler) coloration à l'encre de Chine et au bleu de Lœffler, appliquées aux préparations préalablement fixées — n'ont pas donné de résultats positifs. Toutefois, par ces mêmes méthodes, les résultats devenaient positifs en utilisant comme témoin des cultures de *Klebsiella.*

Par contre, l'examen direct de la culture vivante, fait à l'aide du microscope avec contraste de phase, nous a fourni des résultats positifs. A cette fin, on a utilisé des cultures jeunes de 3—5 heures sur gélose inclinée en suspension dans de l'eau distillée stérile, en parties égales, avec de l'encre de Chine. Comme témoins nous avons toujours utilisé des cultures de *Klebsiella.* Dans ces conditions on a pu observer la présence d'une capsule nette pour les variantes dénommées 24/VII doré, N/VII et N/12. Dans les mêmes conditions d'observation la capsule était absente chez les souches d'origine 24 et N.

La présence de cette formation capsulaire a pu être également démontrée par utilisation d'une nouvelle méthode de microscopie de contraste, mise au point par C. I. Ciurea et coll., méthode qui réalise alternativement un contraste négatif de type « anoptral » et un contraste positif polychromatique.

DISCUSSION

On trouve dans la littérature de nombreuses données concernant l'existence d'une capsule chez le staphylocoque. Ainsi, Gilbert (1931) a décrit pour la première fois une souche de staphylocoque encapsulée, isolée d'un cadavre. En 1937 Lyons, reprenant les recherches sur la présence de cette capsule, affirme son existence et le fait qu'elle possède un antigène de type mis en évidence par des réactions d'agglutination et par son gonflement en présence de l'anticorps correspondant. Selon cet auteur la capsule apparaît seulement chez les cultures jeunes de staphylocoque toxigène.

D'après Valentine (1939), la mort par pyoémie dans les infections staphylococciques serait due à l'encapsulation des germes et, par conséquent, à un renforcement de leur virulence. Toutefois, Spink (1940) infirme les recherches de

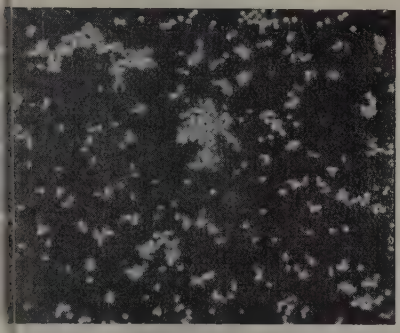


Fig. 1. — Staphylocoque doré, souche 24 initiale. Microscopie à contraste de phase.

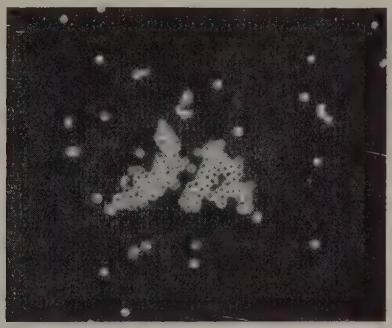


Fig. 2. — Staphylocoque doré, variante 24/VII. Présence de formation capsulaire. Microscopie à contraste de phase.

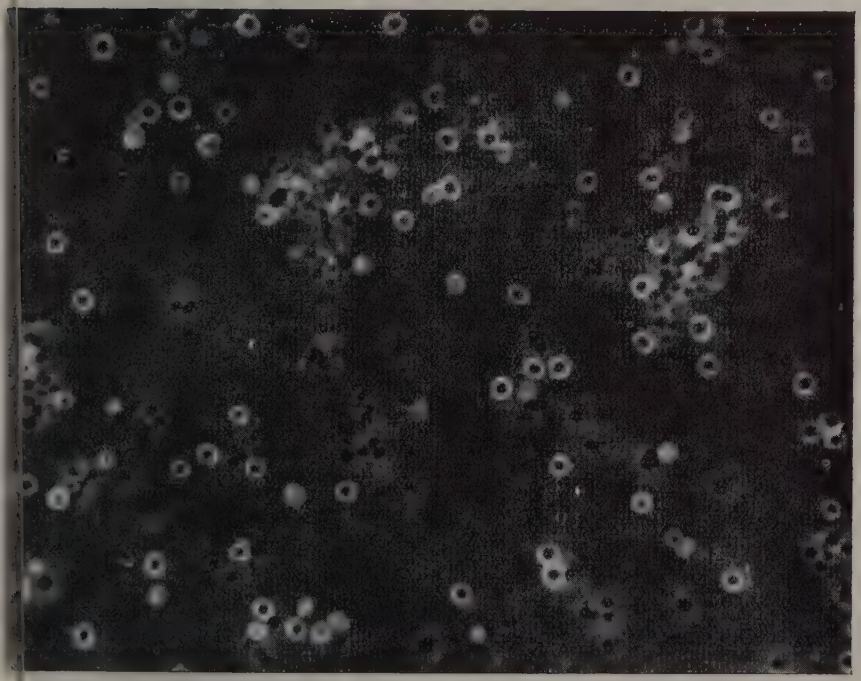


Fig. 3. — Staphylocoque doré, souche 24 et sa variante 24/VII avec formation capsulaire. Microscopie à contraste « chromo-anoptral ».

Lyons, se basant sur le fait qu'il n'a pas réussi à obtenir le phénomène de gonflement de la capsule chez les staphylocoques encapsulés étudiés.

Price et coll. (1945—1956) obtiennent des variantes de staphylocoque doré, mucoïdes, encapsulées, chez lesquelles ils ont observé le phénomène de gonflement de la capsule en présence du sérum immun. Ils affirment que les différences antigéniques des souches d'origine par rapport aux variantes capsulées ne sont que d'ordre quantitatif, le matériel capsulaire apparaissant seulement chez les souches à pathogénité élevée. Reimann (1957) trouve également des variantes mucoïdes encapsulées, mais ne réussit à reproduire ni le phénomène de gonflement de la capsule avec des sérums immuns, ni les réactions d'agglutination. Cohn (1959) confirme la présence de la capsule chez certaines souches de staphylocoque doré pathogène, soutenant que cette capsule confère à ce germe une résistance accrue à l'action nocive des phagocytes, résistance manifestée par la persistance et la viabilité des cocci englobés dans les polymorphonucléaires.

Cependant, la mise en évidence de cette capsule, ainsi que les phénomènes immunologiques que sa présence implique, ne sont pas confirmés par tous les auteurs; ceci est dû probablement au fait que la capsule est peu développée chez le staphylocoque ou qu'elle possède des antigènes très faibles, ce qui ne permet pas d'obtenir des réactions immunologiques positives dans n'importe quelles conditions.

Une autre série d'auteurs ont obtenu des résultats similaires en soumettant le staphylocoque à l'action des extraits d'organes ou leucocytaires (Nutini et coll., 1945, Amano et coll., 1956—1959, etc.). Morse (1960) a étudié la composition du filtrat de culture d'un staphylocoque encapsulé et son rôle dans le phénomène de phagocytose; à cette occasion il a isolé une nouvelle fraction, sans action spéciale leucotoxique, localisée probablement dans la capsule du germe.

Enfin, Sall et coll. (1961) ont également obtenu des variantes pseudo-capsulées de staphylocoque doré par culture de la souche sur milieu contenant des sucres et des vitamines. Les auteurs utilisent le terme de « pseudo-capsule » étant donné que ce phénomène n'a été observé que « in vitro ».

Il résulte des données exposées que les opinions des différents auteurs concordent sur un seul point: sous l'influence des leucocytes, des extraits leucocytaires et d'autres méthodes, le staphylocoque doré peut acquérir une capsule.

Afin de reproduire aussi fidèlement que possible les phénomènes d'interaction entre les phagocytes et les germes, nous avons établi le modèle expérimental décrit dans le mémoire précédent.

Poursuivant les modifications survenues dans les caractères de pathogénité de quelques souches de staphylocoques dorés — isolés des malades — nous avons constaté que sous l'influence des polymorphonucléaires des cobayes ces souches qui, à l'origine n'étaient pas léthales pour cet animal, acquièrent à la suite de ce contact la capacité de le tuer. Nous devons préciser que la forte résistance du cobaye envers le staphylocoque est connue (Amano et coll. 1958); cependant, les variantes que nous avons obtenues, dans nos conditions expérimentales, produisent la mort de cet animal par septicémie, dans environ 24 heures. L'étude des autres caractères de pathogénité chez les variantes, isolées au cours des passages sur polymorphonucléaires de cobaye, n'ont pas révélé des modifications dans la production de la coagulase, de la fibrinolysine, de

'hémolysine, etc. Cependant, les variantes léthales pour le cobaye ont perdu eur type bactériophagique et sont devenues sensibles à la pénicilline et à la treptomycine. Ces données nous ont suggéré l'idée qu'entre la bactérie et le hage et entre la bactérie et le leucocyte s'interpose une barrière qui est capable e défendre le germe aussi bien contre l'action lytique du phage que contre celle actéricide du leucocyte. La facteur de défense apparaît, dans notre modèle xpérimental, seulement à la suite de plusieurs passages «in vivo» sur le leucocyte e cobaye. Les variantes léthales pour ces animaux, maintenues sur milieu de ulture à la température du laboratoire, perdent la capacité de résister à l'action es leucocytes, ce qui ressort clairement du fait qu'en reprenant ces expériences, es premiers passages effectués sur leucocytes de cobaye n'entraînent pas la ort de l'animal.

Nos essais de mettre en évidence la capsule n'ont pas réussi au début, par e fait qu'on a utilisé des techniques par trop brutales de fixation et de coloration e qui, probablement, a eu comme résultat la destruction de cette formation. 'emploi de méthodes qui permettent l'analyse des structures des germes ivants nous a fourni des résultats positifs, confirmant notre hypothèse sur existence de la capsule chez nos variantes, léthales pour le cobaye.

En ce qui concerne les techniques relatives à la coloration de la capsule on ait que Novelli, utilisant la méthode de coloration avec l'Alcian blue 8 GN 150, ans laquelle les polysaccharides capsulaires se combinent à ce colorant, a affirmé, éja en 1953, que cette méthode ne donne pas de résultats satisfaisants pour les ermes Gram-positifs. Gurr (1959) indiquant d'autres méthodes de coloration a btenu des résultats positifs sur une série de germes encapsulés *(B. anthracis, neumococcus, Klebsiella)*, méthodes appliquées par nous sur les staphylocoques olés, mais sans résultats.

Tomcsik et Grace (1955) utilisent pour l'étude de la capsule microbienne microscopie à contraste de phase, méthode par laquelle nous-mêmes avons btenus des résultats satisfaisants.

Mudd et coll. (1943) décrivent la mise en évidence de la capsule chez le neumocoque grâce au phénomène de gonflement par les antisérums, phénomène udié par microscopie électronique. Goodman et coll. (1956) étudient la phago- tose du staphylocoque par les leucocytes humains, toujours à l'aide de la micro- opie électronique.

De toutes les techniques utilisées par nous, c'est seulement l'étude par les vers systèmes de microscopie à contraste de phase et d'amplitude qui nous a ermis de démontrer que les staphylocoques pathogènes venant en contact avec s moyens de défense naturels du macroorganisme, acquièrent à leur tour un uveau moyen de défense — la capsule. Ce phénomène, à notre avis, peut ouvrir nouveaux horizons en ce qui concerne les épidémies actuelles, dues aux aphylocoques.

Il serait possible qu'à la suite de passages successifs des porteurs aux alades, des malades aux autres malades, d'une lésion à une autre lésion, les uches de staphylocoques puissent donner des variantes encapsulées, respon- bles de maladies à formes graves, observées en clinique.

Etant donné l'importance de ce problème nous considérons que des recher- es plus approfondies s'imposent.

CONCLUSIONS

Nos expériences prouvent qu'on peut mettre nettement en évidence une capsule chez les variantes des staphylocoques dorés, obtenues par contact prolongé avec les polynucléaires de cobaye.

Cette capsule a été révélée soit par microscopie avec contraste de phase, soit par la nouvelle méthode de contraste, « chromo-anoptrale ».

Selon nos recherches, seules les souches qui ont présenté cette capsule étaient capables de provoquer la mort par septicémie des cobayes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Mesrobeanu I., Ţaga St., Alexenco E. et Stavri D. — Arch. Roum. de path. exp. et de Microbiologie, 1961, **20,** 579
2. Gilbert I. — J. Bact., 1931, **21,** 157
3. Lyons S. — Brit. J. Exp. Path., 1937, **18,** 411
4. Valentine F. C. O. et Butler E. C. B. — Lancet, 1939, **236,** 973
5. Spink W. W. — J. Immunol., 1940, **38,** 383
6. Price K. M. et Kneeland Y. jr. — J. Bact, 1954, **67,** 472
7. Price K. M. et Kneeland Y jr. — J. Bact., 1956, **71,** 229
8. Reimann H. A. — Proc. Soc. Exp. Biol., 1957, **96,** 411
9. Cohn Z. A. et Morse S. S. — J. exp. Med., 1959, **3,** 419
10. Nutini L. G., Kreke C. W. et Schroeder M. — J. Bact., 1945, **50,** 177
11. Amano T., Leki Y., Kashiba S., Fujikawa K., Marioka T. et Ichikawa S. — Med. J. Osaka University, 1956, **7,** 233
12. Amano T., Kashiba S., Latani M. et Miizu K. — Biken's J., 1958, **1,** 26
13. Morse S. I. — Nature, 1961, **186,** 102
14. Sall T., Mudd S. et Taubler J. — J. exp. Med. 1961, **113,** 963
15. Novelli A. — Experientia, 1953, **9,** 34
16. Gurr G. T. — Biological staining methods, London, 1959
17. Tomcsik Y. et Grace J. B. — J. Gen. Microb, 1955, **13,** 105
18. Mudd S., Heimets F. et Anderson F. T. — J. exp. Med., 1943, **78,** 327
19. Goodman J. R., Moore R. E. et Baker R. F. — J. Bact., 1956, **72,** 737
20. Ciurea C. C., Zahariade C., Ebinger G. et Ieremia T. — Bucarest, (sous presse)

КАПСУЛЯРНЫЕ ФОРМАЦИИ У ВАРИАНТОВ СТАФИЛЛОКОККОВ ПОДВЕРГШИХСЯ ДЕЙСТВИЮ ЛЕЙКОЦИТОВ *IN VIVO*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

У вариантов золотистого стафиллококка, полученных в результате длительного контакта с сегменто-ядерными лейкоцитами морских свинок, может наблюдаться появление выраженного нового капсулярного материала, либо путем использования установки с использованием контрастной фазы, либо при помощи нового «хромо-анопгрального» метода.

Авторы считают что этот капсулярный материал может вызвать смерть морских свинок вследствие сентицемии.

KAPSELBILDUNG BEI STAPHYLOKOKKEN VARIANTEN, DIE DER EINWIRKUNG VON LEUKOZYTEN *IN VIVO* AUSGESETZT WERDEN

ZUSAMMENFASSUNG

Durch längeren Kontakt mit polymorphkernigen Meerschweinchenleukozyten erhaltene Varianten von *Staphylococcus aureus* können ein klar ausgeprägtes Kapselmaterial aufweisen, das entweder durch Phasenkontrastmikroskopie oder durch eine neue «chromo-anoptrale» Methode nachgewiesen werden kann. Nach Ansicht der Verfasser, ruft dieses Kapselmaterial den Tod der Meerschweinchen durch Septikämie hervor.

CAPSULAR STRUCTURES IN STAPHYLOCOCCAL VARIANTS SUBJECTED TO THE *IN VIVO* ACTION OF LEUKOCYTES

SUMMARY

Variants of *Staphylococcus aureus* obtained by prolonged contact with guinea-pig polymorphonuclear leukocytes may display a clearly defined capsular material which is demonstrable either by phase contrast microscopy or by a new « chromo-anoptral » method. This capsular material is considered to cause death of the guinea-pigs due to septicaemia.

ECHERCHES SUR LE RÔLE DE LA RADIATION IONISANTE DANS L'INFECTION EXPÉRIMENTALE AVEC DES STAPHYLOCOQUES PATHOGÈNES

par

N. Nestoresco, S. Beneş et I. Strîmbeanu

Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » et du Centre des Recherches Radio-Biologiques-Bucarest)

— Manuscrit reçu le 20 avril 1961 —

Le problème des effets biologiques de la radiation ionisante, en général, celui des interrelations de la maladie d'irradiation avec les différentes infections bactériennes ou virotiques, en particulier, ont occupé une place importante ans les recherches scientifiques, biologiques et médicales, dès le début de notre ècle, et surtout à partir de 1944.

La plupart de ces recherches se réfèrent à la radiation externe — surtout X u gamma — par administration unique d'une dose sous-léthale, léthale ou uper-léthale (centaines ou même milliers de r) en conditions variées d'expéri- entation avec différents germes (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Dans l'ensemble, les résul- ts de ces recherches présentent certains traits communs quant aux symptômes l'histopathologie de la maladie d'irradiation, mettant en évidence l'actino- nsibilité des différents organes et systèmes, ainsi que l'efficience biologique nérale exprimée par les doses de léthalité cumulative pour différentes espèces imales et intervalles de temps (par ex. DL_{50}, 30 jours etc). Par contre, l'étude l'action d'une dose réduite de radiations ionisantes, soit en administration nique, soit répétée à divers intervalles (jours — semaines), ou même ininter- mpue pendant des mois ou des années, jusqu'à l'accumulation d'une dose sous- thale, léthale ou super-léthale, a été moins approfondie (1, 2, 3, 8, 9, 10, , 12, 13, 14, 15, 16, 17). D'autre part, les recherches de ce genre présen- ent des résultats dont la corrélation était plus difficile, parfois contradictoire, offrant pas la possibilité d'établir les aspects fondamentaux et les cœfficients efficience biologique. En ce qui concerne le problème des interrelations entre hôte irradié et les agents infectants, certains auteurs ont également été préoccupés par les modifications des propriétés de certains microorganismes à la suite de leur passage par le macroorganisme soumis à l'irradiation , 17).

C'est ce qui nous a déterminé à étudier certains aspects du rôle joué par la diation X, administrée en 13 doses à 50 r chaque, dans l'infection expéri- entale des lapins par le staphylocoque pathogène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été faites sur 18 lapines non-gestantes, de race Chinchilla pesant 1.410—1.645 g, réparties en trois lots:

Lot I, comprenant les animaux numéros 1 à 6, irradiés et infectés ensuite.

Lot II, comprenant les animaux numéros 14 à 19, infectés dans les mêmes conditions, mais non-irradiés.

Lot III comprenant les animaux numéros 8 à 13, irradiés sans être infectés.

Les lots II et III ont servi de témoins.

Irradiation. Les animaux appartenant aux lots I et III ont été soumis à l'irradiation totale de l'organisme à l'aide d'un appareil de roentgen-thérapie « Stabilivolt ». On a effectué 13 séances d'irradiation pendant 44 jours, à intervalle de 3—4 jours, en doses de 50 r par séance. Les facteurs d'irradiation ont été: 180 kW, 10 mA, filtre de 0,5 mm Cu et 1m distance.

Infection. Trois jours après la dernière séance d'irradiation, les animaux des lots I et II ont été inoculés (voie intraveineuse) avec 40 milions germes d'une culture de 24 heures sur gélose nutritive d'une souche de *Staphylococcus aureus*, type bactériophagique 80/81. La détermination du nombre des germes a été effectuée selon l'étalon néphélométrique international de l'O.M.S. Quatre-vingt-dix jours après l'infection, les animaux survivants ont été sacrifiés.

Déterminations. Au cours de l'expérience on a effectué les déterminations suivantes:

a) Leucogramme — 18 déterminations pour chaque animal.

b) Agglutinines — 6 déterminations à des intervalles variant entre 5—28 jours. Comme antigène nous nous sommes servis de la souche infectante préparée comme suit: culture de 4 heures en bouillon nutritif, tuée par ébullition pendant 1 minute; après centrifugation, le sédiment est lavé et repris en solution isotonique de NaCl, jusqu'à opacité 18 U.I., additionné de 0,3% formol. Les tubes de réaction ont été conservés pendant 18 heures à 37°; lecture à l'œil nu.

c) L'antistaphylolysine α a été étudiée à 5—28 jours d'intervalle, en présence de la toxine du staphylocoque Wood. La d.t.h. de la toxine a été déterminée toutes les fois par rapport au sérum étalon international.

d) Poids — les animaux ont été pesés 16 fois au cours de l'expérience.

e) Examens anatomo-pathologiques — effectués après la mort spontanée de l'animal ou après l'avoir sacrifié, ils ont interessé différents organes: cerveau, bulbe, cœur, poumon, glandes surrénales, rate, foie, côlon, intestin grêle et mœlle sternale.

f) Afin de mettre en évidence les éventuelles modifications — subies par la souche infectante à la suite des passages par animal — on a étudié les staphylocoques isolés du sang, des reins, du foie, de la rate, du cerveau, du bulbe, des poumons et, dans certains cas, de la vessie urinaire. Les souches isolées ont été déterminées par lysotypie — en vue de l'identification — avec la souche infectante et étudiées ensuite du point de vue caractères morphologiques, tinctoriaux, biochimiques, de métabolisme, caractères de pathogénité (toxines) et sensibilité aux antibiotiques couramment employés.

RÉSULTATS

a. *Leucogramme.* Le nombre de leucocytes déterminé avant l'irradiation l'infection des animaux a varié entre des limites larges par rapport aux chiffres nsidérés « normaux » (la différence allant jusqu'à 11.000 éléments).

La formule leucocytaire — antérieure aux expériences — montrait égale- ent, quant à la proportion des éléments, une variation individuelle marquée: anulocytes amphophiles variant entre 8 et 50%, basophiles 0—14%, sinphiles 0—6%, monocytes 1—12%, lymphocytes petits 14—80%, grands mphocytes 0—11%, cellules réticulaires (éléments non-mûrs provenant de la me réticulaire) 0—6%.

Pendant l'irradiation des lots I et III, on a observé une tendance à la leuco- nie déjà à partir du deuxième jour d'irradiation (après une dose de 100 r), ccentuant à mesure que de nouvelles doses s'accumulaient.

Le lot III (iradié et non-infecté) chez lequel le leucogramme a pu être oursuivi pendant plus longtemps, a montré une tendance au rétablissement ucocytaire à peine à 11—17 jours après la fin de l'irradiation. On a également nstaté d'importantes différences de la réactivité individuelle, ce lot présentant e proportion de granulocytes amphophiles variant entre 23—69% et plus, fonction des particularités individuelles par rapport au taux constaté avant radiation.

Le lot I (irradié et infecté) présentait trois jours après l'infection: une ucocytose modérée, suffisamment significative par rapport à la leucopénie rsistente et accentuée du lot irradié et non-infecté. Ce lot montre également même tendance à la modification du rapport granulocytes amphophiles/lym- ocytes en faveur des premières, atteignant une proportion d'amphophilie passant de 12—30% le taux constaté avant l'infection.

Le lot II (infecté et non-irradié) a présenté une réaction leucocytaire importante teignant des chiffres élevés (14.000—25.000/ml). De même que pour les autres s, on a constaté des particularités individuelles en ce qui concerne le quantum la leucocytose, le moment ou il atteint son maximum et celui où il revient x chiffres normaux. Quant à la tendance vers l'amphophilie, elle est lement marquée, dépassant parfois de 30% le taux maximum antérieur 'infection.

Un aspect particulier de la réactivité sanguine est celui de la réaction mono- aire, parfois persistente, accentuée chez les lots infectés, indépendemment l'application ou la non-application des rayons X, sa proportion pouvant teindre jusqu'à 25% des taux indiqués. On n'a pu établir une corrélation re cette réaction monocytaire et les modification subies par le nombre des cocytes.

b. *Agglutinines.* Les recherches ne concernent que les lots infectés (I et La première détermination effectuée un jour avant l'infection a montré titres variant entre 1/400—1/800; dix jours après l'infection le titre agglu- ant des sérums a augmenté jusqu'à 1/1280—1/2560, tant chez les animaux diés que chez les non-irradiés. En général, les deux lots, considérés en bloc, nt pas montré des différences de réactivité (titre maximum des aggluti- es, moment de leur apparition et leur persistance). Le titre des agglutinines r les deux lots est présenté dans le tableau I.

Tableau I

Titre des agglutinines

Date	9 mai	20 mai	26 mai	31 mai	7 juin	5 juillet	Date de la mort	
Contrôles:	I	II	III	IV	V	VI		
1	1/640	1/1280	1/1280	1/1600	1/1600	1/1600	6 juillet	LOT IRRADIÉ
2	1/400	1/1280	1/1600	1/1600	1/1280	1/1280	11 juillet	LOT IRRADIÉ
3	1/640	1/1280	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	sacrifié le 8 août	LOT IRRADIÉ
4	1/400	1/400	—	—	—	—	22 mai	LOT IRRADIÉ
5	1/640	1/1280	1/2560	1/2560	—	—	5 juin	LOT IRRADIÉ
6	1/400	1/2560	1/800	1/800	—	—	1 juin	LOT IRRADIÉ
14	1/640	1/1280	1/1600	1/1600	1/1600	1/1600	sacrifié le 8 août	LOT NON-IRRADIÉ
15	1/640	1/1280	1/1280	1/1280	1/1600	1/1600	sacrifié le 8 août	LOT NON-IRRADIÉ
16	1/400	1/1280	1/1280	1/1600	1/1600	1/1600	sacrifié le 8 août	LOT NON-IRRADIÉ
17	1/400	1/2560	1/3200	—	—	—	30 mai	LOT NON-IRRADIÉ
18	1/400	1/1280	—	—	—	—	21 mai	LOT NON-IRRADIÉ
19	1/800	1/2560	1/1600	1/1600	1/1280	1/800	sacrifié le 8 août	LOT NON-IRRADIÉ

↑ infection

c. *Antistaphylolisine* α (déterminée seulement sur les lots infectés). Les deux lots ont présenté la veille de l'infection un titre inférieur à 0,05 U.A./ml, à l'exception d'un cas qui a atteint 0,5 U.A./ml. Dix jours après l'infection, quatre des animaux du lot II (non-irradié) et deux du lot I (irradié) ont presenté des titres oscillant entre 0,1—7,5 U.A./ml, les autres animaux ne dépassant pas la limite initiale. Le 16-e jour un seul animal continuait à présenter encore un titre au-dessous de la limite (lot irradié). Les titres maxima atteints pendant l'expérience ont été:

— lot irradié: 0,05—3,3—5—7,5—10—12 U.A./ml
— lot non-irradié: 0,3—0,4—4—7,5—25 U.A./ml

Tableau II

Titre de l'antistaphylolysine α

Date	9 mai	20 mai	26 mai	31 mai	7 juin	5 juillet	23 juillet	2 août	Date de la mort	
Contrôles :	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII		
1	<0.05	<0.05	0.2	2	5	10	—	—	6 juillet	LOT IRRADIÉ
2	<0.05	<0.05	2	12	7.5	12	—	—	11 juillet	
3	<0.05	<0.05	<0.05	0.5	0.5	4	12	7.5	sacrifié le 8 août	
4	<0.05	<0.05	—	—	—	—	—	—	22 mai	
5	<0.05	2	2	3.3	—	—	—	—	5 juin	
6	<0.05	0.1	5	3	—	—	—	—	1 juin	
14	<0.05	<0.05	0.4	10	25	12	12	10	sacrifié le 8 août	LOT NON-IRRADIÉ
15	0.5	7.5	4	4	3	4	4	2	sacrifié le 8 août	
16	<0.05	2	2	2	2	2	3	7,5	sacrifié le 8 août	
17	<0.05	<0.05	0.4	—	—	—	—	—	30 mai	
18	<0.05	0.3	—	—	—	—	—	—	21 mai	
19	<0.05	4	2	3	3	4	4	2	sacrifié le 8 août	

↑ infection

On n'a pas constaté de différences essentielles entre les réactions des deux s considérés dans leur ensemble, par rapport au délai de l'installation du titre ximum, sa durée et ses oscillations. Les titres des antistaphylolysines α sont sentés dans le tableau II.

d. *Courbe pondérale* (tableau III). Le lot II « non-irradié — infecté » pré- tait des courbes ascendentes jusqu'au moment de l'infection, avec des varia- s allant de 10—190 g et une moyenne du poids maximum de 2.230 g. A la e de l'infection, 5 animaux ont commencé à maigrir, deux d'entre eux pré- tant une courbe descendante continue jusqu'à l'exitus, les trois autres un ressement qui s'est maintenu jusqu'au moment ou ils ont été sacrifiés. La

Tableau III

Poids des animaux

Date:	21 mars	24 mars	30 mars	6 avril	13 avril	20 avril	28 avril	9 mai	18 mai	24 mai	31 mai	6 juin	20 juin	5 juillet	23 juillet	2 août	Date de la mort	
Contrôle:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI		
1	1410	1490	1550	1630	1720	1750	1730	1920	1850	1660	1740	1850	1950	2100	—	—	6 juillet	Lot I irradié-infecté
2	1445	1520	1450	1610	1385	1490	1550	1640	1670	1570	1490	1500	1450	1280	—	—	11 juillet	
3	1510	1620	1690	1875	1700	1640	1735	1875	1370	1640	1790	1920	2100	2250	2610	2830	sacrifié le 8 août	
4	1560	1570	1560	1600	1800	1930	1920	1700	1600	—	—	—	—	—	—	—	22 mai	
5	1590	1750	1845	2100	2090	2290	2375	2740	2260	1850	1580	—	—	—	—	—	5 juin	
6	1620	1830	1960	1930	1885	2170	2080	2100	1650	1450	1300	—	—	—	—	—	1 juin	
8	1410	1390	1415	1520	1430	1570	1520	1460	1520	1620	1690	2050	2270	2200	2450	2770	sacrifié le 8 août	Lot III irradié
9	1450	1500	1660	1780	1940	1980	1910	1870	1790	1520	1340	—	—	—	—	—	2 juin	
10	1510	1640	1700	1845	1960	1980	1970	2000	1630	1600	1650	2050	2250	2520	2700	3000	sacrifié 8 août	
11	1550	1685	1685	1840	1620	1440	1520	1600	1210	—	—	—	—	—	—	—	18 mai	
12	1570	1690	1640	1810	1880	1820	1920	—	—	—	—	—	—	—	—	—	8 mai	
13	1615	1900	1970	2890	2520	2680	2865	3080	3200	3170	3600	3800	3950	4320	4350	4750	sacrifié le 8 août	
14	1400	1625	1620	1680	1845	2020	2050	2130	1800	1870	1790	1800	1950	2300	2590	2600	sacrifié le 8 août	Lot II infecté
15	1410	1670	1730	1850	2030	2050	2120	2160	1950	1830	1950	2130	2250	2350	2600	2760	sacrifié le 8 août	
16	1510	1555	1470	1530	1710	1680	1830	2000	2040	1800	1950	2280	2100	2200	2700	2890	sacrifié le 8 août	
17	1560	1430	1470	1770	1890	1820	1990	2200	1780	1545	—	—	—	—	—	—	30 mai	
18	1600	1930	1990	2220	2295	2460	2350	2540	1830	—	—	—	—	—	—	—	21 mai	
19	1645	1900	1955	2160	2290	2350	2320	2160	2210	2120	2230	2520	2450	2745	2900	3000	sacrifié le 8 août	

↑ infection des lots I et II

ième lapine a présenté une courbe ascendante constante, avec de légères illations.

Le lot I « irradié-infecté » a présenté: quatre courbes ascendantes avant fection avec oscillations de 10—235 g et une moyenne du poids maximum 2.046 g, une courbe d'abord ascendente puis descendente et une courbe tivement stationnaire (différence de 195 g entre les deux extrémités, avec variations de 70—225 g). A la suite de l'infection, tous les animaux ont nmencé ou continué à perdre du poids, quatre présentant des courbes descentes jusqu'à l'exitus, les deux autres se redressant jusqu'à leur mort ntanée ou leur sacrification.

Le lot III « irradié—non-infecté » a présenté: quatre courbes ascendantes qu'au moment de la mort spontanée ou la sacrification, une d'entre elles t relativement stationnaire dans la période d'irradiation (différence de 50 g re les extrémités et des oscillations de 20—140 g) et une autre présentant crochet descendant de 400 g entre le 2—17-e jour à partir de l'accumulation 650 r, redevenant ascendante par la suite. Les deux autres courbes sont bord ascendantes et ensuite descendantes jusqu'à l'exitus, la baisse se manifestant le 35-e jour, respectivement le 55-e, à partir du début de l'irradiation. courbes du poids des animaux en expérience sont indiquées dans le leau III.

e. *Examens histopathologiques.* Les préparations effectuées ont présenté lésions d'aspect et d'intensité variable, par rapport au lot examiné.

Le lot III « irradié—non-infecté » présentait des lésions, isolées ou associés, traduisant la maladie d'irradiation et le processus inflammatoire.

Les lésions traduisant la maladie d'irradiation étaient représentées par modifications qui affectent les parenchymes sensibles à l'irradiation, en iculier les organes hématopoïétiques, lymphopoïétiques et la muqueuse stinale. Le degré des altérations était en général moyen, se traduisant pour lupart des cas par la persistence des proliférations mitotiques suivie de ndance réparatoire ainsi que par l'interpénétration des phénomènes dégénés et régénératifs. Dans *la rate* on a trouvé, outre l'hyperplasie réticulaire maux nos. 8, 9, 10, 13), les lésions suivantes: follicules atrophiques et hyperphiques à centre germinatif et mitoses (no. 10) accompagnés par une congestion intense (no. 13), hypertrophie folliculaire avec raréfaction des centres minatifs, micronécrose centrale et absence des mitoses (no. 8), atrophie liculaire avec disparition des centres germinatifs et des mitoses (no. 9), atrophie nique avec disparition des follicules lymphoïdes, nécrose de la pulpe avec rogénéisation de tissu, absence de la réaction hyperplasique réticulaire mant une inhibition splénique totale (nos. 11 et 12). *Les reins* présentaient, tous les cas, des lésions étendues, dystrophiques — dégénératives tubulaires de type protidique, parfois avec formation de cylindres. Dans *les poumons*, observe l'épaississement accentué des parois alvéolaires chez trois des six maux (nos. 8, 10, 13). Dans *le foie :* lésions d'hépatite parenchymateuse dégénative, modérées et réversibles (nos. 8, 9, 11), allant de la dystrophie protidique graisseuse, parfois avec mitoses Kupffer et cellules éosinophiles interstitielles 11) jusqu'aux dystrophies intenses (no. 10) ou même irréversibles (nos. 12,). *Les glandes surrénales* présentaient sans exception un amincissement de ne glomérulaire de la corticale.

Soulignons la persistance de l'hématopoïèse normale et intégrale dans la mœlle sternale.

Les lésions de type inflammatoire ont été observées surtout dans *les reins*, chez quatre animaux (nos. 8, 9, 10, 13), qui présentaient une néphrite interstitielle à structure radiale et de rares microabcès, lésions plus intenses chez le lot irradié que chez le lot non-irradié. Deux animaux (nos. 11, 12) n'ont pas présenté des lésions inflammatoires. Dans *le système nerveux central* (cerveau, bulbe) on observe des nodules et des infiltrats inflammatoires avec lymphocytes et rares polynucléaires, pareilles à ceux du lot non-irradié; deux animaux (nos. 8 et 9) sur 6 présentaient également des infiltrats inflammatoires périvasculaires accentués, avec foyer de nécrose cérébrale et infiltration méningée (no. 13). Le *foie* présentait des lésions d'hépatite interstitielle chronique (portite et lymphome Wagner) (nos. 8, 9, 10, 11, 13) plus discrètes chez le no. 11. La lésion la plus accentuée, trahissant l'association de l'infection et de l'inflammation secondaire sur un fond de lésions primaires actiniques, a été observée dans la muqueuse du côlon et de l'intestin grêle, allant de l'entérite sous-aiguë avec érosion et exfoliation (nos. 10, 13) jusqu'à la forme aiguë, ulcérative, avec destruction épithéliale importante (nos. 8, 9), réalisant parfois le tableau de l'entérite nécrotique (nos. 11, 12). Le reste des organes examinés n'a pas présenté d'altérations décélables.

Le lot II « non-irradié—infecté » a présenté des lésions inflammatoires aiguës, sous-aiguës ou chroniques avec une forte dissémination viscérale et cérébrale et une remarquable intensité évolutive, entraînant des lésions dystrophiques et dégénératives dans les parenchymes organiques. Dans *le système nerveux central*, on a observé chez 5 des 6 animaux (nos. 14, 15, 16, 18, 19) des nodules et infiltrations diffuses inflammatoires à structure lymphocytaire, ainsi que des lésions dégénératives neuroniques avec nodules de neuronophagie et une méningite exsudative évidente (d'intensité plus réduite chez les nos. 16 et 19). Quatre animaux ont présenté dans *les poumons* des lésions de pneumonie interstitielle chronique, accompagnée de péribronchite scléro-hypertrophique, l'épaississement des septs alvéolaires et infiltrations lympho-histiocytaires (nos. 14, 15, 16, 19), lésions qui ne paraissent pas spécifiques à l'infection staphylococcique, pouvant être dues à une virose. Deux animaux (nos. 17, 18) n'ont pas eu de lésions pulmonaires. *Le foie* a présenté des lésions évidentes d'hépatite interstitielle sous-aiguë ou chronique (portite et lymphomes Wagner) (nos. 14, 15, 16, 18, 19), lésions plus prononcées que celles du lot III non-infecté, d'origine sûrement microbienne allant jusqu'aux micronodules nécrotico-inflammatoires (16), accompagnés par des lésions d'hépatite parenchymateuse dégénérative (dystrophies protidiques et graisseuses) à caractère limité (nos. 14, 15, 18, 19) ou très étendues (no. 16). *La rate* a présenté sans exception des lésions inflammatoires septiques réalisant des aspects de splénite hypertrophique et hyperplasique sous-aiguë, avec hyperémie intense. *Les reins* présentaient des lésions modérées ou évidentes de néphrite interstitielle chronique ou sous-aiguë (nos. 14, 15, 16, 18, 19) apparemment ascendente (pyélonéphrite), accompagnées par des lésions modérées ou intenses de néphrite parenchymateuse dystrophique tubulaire, parfois avec des cylindres hyalins (trouvés aussi chez le lapin no. 17). Le *gros intestin* a montré des lésions d'entérite sous-aiguë érosive (no. 17) ou d'entérite aiguë ulcéro-nécrotique avec hyperplasie et hypertrophie des follicules lymphoïdes (nos. 14,

, 16, 18, 19). Les mêmes lésions sont retrouvées dans l'intestin grêle (nos. 14, , 18). Dans certains cas on a constaté une entérite sous-aiguë ulcérative (nos. , 19) ou l'absence de lésions (no. 17). *Le myocarde* a présenté chez 4 animaux os. 15, 16, 17, 18) des lésions de myocardite interstitielle. Les autres organes aminés n'ont pas présenté des lésions décélables.

Signalons qu'à l'analyse cytologique des exsudats et des infiltrats inflam- atoires on a trouvé des éléments cellulaires ronds (lymphocytes, polyblastes, stiocytes).

Le lot I « irradié-infecté » a présenté — par rapport aux précédents — e amplification et exacerbation de la dissémination et de l'évolution des lésions flammatoires et dégénératives. Des tableaux inflammatoires histopathologiques allure aiguë font leur apparition et de nouveaux et graves aspects dégénératifs squissent dans quelques-uns des viscères: une déperdition intravasculaire s cellules hépatiques, l'atrophie de la muqueuse intestinale, broncho-pneu- onie avec cellules géantes. Le côlon et l'intestin grêle sont parsemés de lésions aucoup plus graves que celles observées chez les lots précédents. Tous les imaux ont présenté une atrophie accentuée de la muqueuse intestinale (plus odérée toutefois chez le no. 4) et des phénomènes d'entérite catarrhale accentuée érosive (de même plus modérée chez le no. 4). Deux animaux (nos. 1, 2) ont ésenté des ulcérations de type radio-nécrotique et l'inhibition des mitoses isi que des phénomènes régénératifs épithéliaux et glandulaires. *Les reins* montré des lésions de dystrophie protidique tubulaire à caractère modéré os. 1, 2, 3), intermédiaires (no. 6) ou massives (no. 5), parfois avec formation cylindres (nos. 2, 3). Quatre animaux ont présenté des lésions de type inflam- toire allant de la congéstion modérée (no. 2), intense avec pigment de prove- nce hemolytique (no. 1) ou rares nodules lymphocitaires (no. 4) jusqu'à la hrite interstitielle « aiguë » avec micro-abcès dans les papilles rénales (nos. ,3). Dans *les poumons :* lésions de pneumonie interstitielle chronique (nos. 1, ,3, 5, 6) allant de la simple congestion avec épaississement des septs (no. 5) a congestion intense avec épaississement de ces derniers, œdème, infiltration ffuse ou des nodules lympho-polyblastiques (nos. 1, 2, 3) ou même jusqu'à ronchopneumonie avec cellules géantes (nos. 6). Nous avons constamment uvé des lésions de péribronchite scléro-hypertrophique. *Le foie* a présenté s exception des lésions inflammatoires, allant de l'inflammation discrète a v. porte (nos. 1, 2, 4, 6) ou modérée (no. 3), associée parfois à une conges- n intense et pigments hémosydérotiques (no. 2), jusqu'à la déperdition travasculaire des cellules hépatiques (nos. 1, 2, 5), phénomène d'origine toxico- ammatoire non-rencontré chez les lots précedents. Les lésions de dystrophie tidique ont été trouvées chez trois animaux, sous forme discrète (nos. 1, 2) étendue (no. 3). *La rate* a montré des lésions plus amples que chez les lots cédents. Deux animaux (nos. 1, 4) présentaient une atrophie modérée, mais vlente des follicules lymphoïdes avec l'atrophie de la pulpe rouge et hyper- ie réticulaire et, chez l'animal no. 4, un congestion intense. Les autres quatre maux (nos. 2, 3, 5, 6) présentent une splénite aiguë congestive, érythrophagie ndante, follicules lymphoïdes avec centres germinatifs de taille inferieure normale et hyperplasie réticulaire. *Les glandes surrénales* présentaient sans ption un amincissement de la couche glomérulaire, hyperplasie fasciculaire ots de cellules éosinophiles dans la médullaire. Dans *le système nerveux central,*

nous avons observé des lésions de méningite chez deux lapins, respectivement de méningite aiguë avec du pus et nécrose de la substance cérébrale sous-méningée (no. 1) et exsudat méningé, infiltration lymphocytaire et manchons périvasculaires cérébraux avec lymphopolyblastes (no. 3). Les autres quatre animaux n'ont pas présenté de lésions visibles dans le système nerveux central (nos. 2, 4, 5, 6). Les restes des organes examinés paraissaient indemnes.

Nous signalons que ce lot a présenté également des éléments cellulaires ronds (lymphocytes, polyblastes, histiocytes) observés dans les infiltrations et les exsudats examinés.

Mortalité des animaux. La mortalité des animaux est présentée en ordre chronologique dans le tableau IV et la graphique 1. On y constate:

— les deux premiers animaux (nos. 12, 11) faisant partie du lot III non-infecté ont survécu 2 et respectivement 11 jours après la dernière irradiation; un troisième animal de ce lot a succombé 26 jours après la dernière irradiation (no. 9);

— quatre animaux faisant partie — alternativement — des lots II « non-irradié » et I « irradié » (nos. 18, 4, 17, 6) ont succombé entre le 11—22-e jour à partir de l'infection;

— trois animaux du lot irradié-infecté (nos. 5, 1, 2) ont succombé entre le 26—62-e jour à partir de l'infection;

Tableau IV

Mort des animaux

	1	2	3	4	5	6	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
9 mai											+							
18 mai										+								
21 mai																	+	
22 mai				+														
30 mai																+		
1 juin						+												
2 juin								+										
5 juin					+													
5 juillet	+																	
11 juillet		+																
sacrific. 8 août			Δ				Δ		Δ			Δ	Δ	Δ	Δ			Δ
			↑ Lot I irradié-infecté						↑ Lot III irradié						↑ Lot II infecté			

\+ — mort spontanée
Δ — animaux sacrifiés

— le reste des animaux survivants a été sacrifié le 90-e jour à partir de nfection, comme suit:

— du lot « irradié—non-infecté » les nos. 8, 10 et 13;
— du lot « non-irradié—infecté » les nos. 14, 15, 16, 19;
— du lot « irradié—infecté » le no. 3.

Cultures. De toutes les cultures des phylocoques isolés des animaux fectés, nous avons considéré comme us-cultures de la souche infectante lement les souches de type bacté-phagique 80/81. Nous avons récupéré souche infectante des animaux à tir de leurs produits pathologiques, nme suit:

— *Lot irradié :*

l'animal no. 4 — des reins, cer-u, foie, urine;

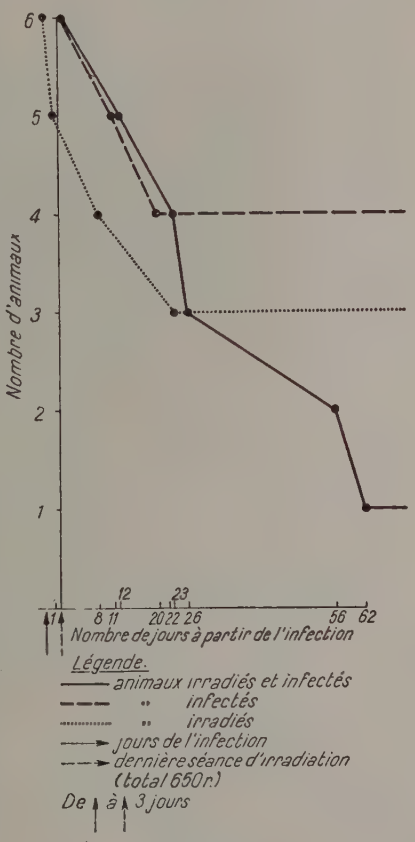
— *Lot non-irradié :*

l'animal no. 5 — des reins, poumon, e;
l'animal no. 17 — des reins;
l'animal no. 18 — du sang du r.

L'étude des caractères de ces sou-s a été effectué en parallèle sur:

— les cultures provenant de trois quatre colonies isolées des organes tionnés;
— les cultures provenant de 10 nies isolées à partir de la souche ale.

La culture isolée du rein de l'animal 5, s'est dissociée en colonies dorées olonies de couleur citrin-foncé par rsion sur gélose nutritive. Le com-ement de cette culture a été diffé-à certains égards, du reste des res isolées des animaux et de la souche infectante, cultures qui se sont compor-de manière identique. Notant la première culture par 5R/2 et les autres « témoin », nous exposons dans le tableau V les différences constatées.



Graphique 1

DISCUSSION

On constate, au premier abord, que des deux lots infectés, le lot irradié senté la plus grande mortalité — un seul survivant — tandis que dans non-irradié il y a eu 4 survivants. Du point de vue mortalité, le lot irradié

et non-infecté se situe entre les deux premiers lots — 3 survivants —. Nos expériences, étant effectuées sur un nombre réduit d'animaux, ne permettent pas de tirer des conclusions du point de vue statistique: toutefois, l'ordre progressif de l'« éfficacité » des noxes administrées semble être: infection, irradiation, irradiation + infection.

Tableau V

Comportement des colonies isolées des organes

Cultures	5R/2		Témoin
Pigment	citrin-foncé		doré
Hémolyse à chaud	sang de lapin	négatif	++
	sang de mouton	négatif	++
Gélatine	négatif après 96 heures à 37°C		positif après 48 heures à 37°C
Fibrinolysine après 24 heures	aire de 1—2 mm ∅		aire de 8—9 mm ∅
Titre de la toxine	1/10		1/1000—1/5000

D'autre part, les résultats des examens anatomo-pathologiques, dans leur ensemble, situent les lésions les plus profondes et les plus amples dans le lot I « irradié-infecté ». Le lot II « non-irradié—infecté » a réalisé, comparativement, des lésions de moindre importance, le lot III « irradié et non-infecté » se situant comme intensité des lésions entre les précédents. Il paraît donc que nous retrouvons le même ordre de l'« efficacité » des noxes, esquissé plus haut. Ce fait nous paraît explicable si nous considérons que:

— *les lésions du lot non-irradié* ont été provoquées par l'infection expérimentale avec germes virulents et toxigènes, sans association d'autres noxes, infection qui a affecté presque tous les organes examinés à l'exception des surrénales et de la moelle sternale;

— *les lésions du lot irradié-non-infecté* représentent l'effet cumulatif de l'irradiation et de l'infection endogène provoquée par celle-ci, par renforcement de la virulence de la flore commensale et éventuellement au moyen de l'exacerbation de certaines viroses ou microbioses spontanées plus ou moins latentes chez les animaux. Pour cette hypothèse plaident les lésions inflammatoires constatées dans les reins, foie, système nerveux central, et surtout dans l'intestin. L'infection endogène a parfois engendré des lésions non-rencontrées chez le lot « non-irradié — infecté », telles les microabcès rénaux chez certains animaux.

Les lésions inflammatoires de ce lot sont, en général, moins intenses et moins étendues que celles du lot précédent; néanmoins, l'ensemble du tableau histopathologique est plus complexe. Il résulte des données anatomo-pathologiques de ce lot que *les organes le plus profondément affectés par l'irradiation ont été*

ntestin, la rate et le foie. Ce fait pourrait expliquer en partie l'origine de l'in-tion endogène, ainsi que son développement par l'inhibition des moyens de fense de l'organisme. Contrairement à notre attente, l'irradiation a ménagé 'ématopoïèse, fait confirmé par les données hématologiques. Le myocarde a de même exempt de lésions, le reste des organes étant atteints à différents grés;

— *les lésions du lot « irradié-infecté »* représentent le résultat: de l'action ecte de la radiation ionisante, de l'infection endogène et expérimentale; il st pas exclu que l'aggravation réciproque de ces dernièrs facteurs joue rôle important dans l'ampleur et la sévérité, parfois excessive, de l'image topathologique réalisée. Dans ce sens, plaident egalement les aspects topathologiques qui manquent chez les lots précédents, tels: l'atrophie la muqueuse intestinale, la broncho-pneumonie ou la déperdition intra-culaire des cellules hépatiques. La sollicitation, particulièrement impor-te, imposée aux animaux de ce lot, est également témoignée par les rénales, qui, contrairement aux lots antérieurs, ont réagi — dans tous les — par une hyperplasie de la zone fasciculaire, avec des îlots d'éosinophilie dullaire.

L'examen anatomo-pathologique des animaux, pris individuellement, èle également différentes particularités de la réactivité de l'organisme, ce nous détermine a considérer que les causes de la mort ne sont probab-ent pas les mêmes pour chaque lot, considéré séparément.

Dans le cadre des discussions sur les données histopathologiques il nous ble utile de révéler certains aspects du comportement de quelques organes. point de vue sensibilité à l'irradiation et de la capacité générale de réagir, *ate* et le *poumon* semblent se situer sur des positions opposées. Le mon a été indemne chez tout les animaux succombés du lot II et III, dis que la rate a été affectée chez tous les animaux en expérience. Il en lte, dans une certaine mesure, que le poumon détiendrait le rôle d'un ce de l'intensité avec laquelle l'organisme est sollicité, cet organe étant plètement indemne chez deux animaux du lot infecté, chez trois du lot adié » et chez aucun des animaux du lot « irradié-infecté ».

Le système nerveux central n'a présenté que des lésions déterminées par rection, celles du lot « non-infecté » étant — probablement — dues à une tion secondaire, vu que les symptômes d'une action directe de l'irradiation issent faire défaut. Si nous considérons que le système nerveux central indemne que dans un seul cas (no. 17) du lot « infecté » et dans quatre du lot « irradié-infecté » (nos. 2, 4, 5, 6), sa sensibilité extrêmement dite à l'action de la radiation ionisante apparaît comme évidente. On peut les mêmes considérations en ce qui concerne le myocarde, qui ne présente des lésions d'ordre infectieux et seulement chez quatre des six animaux ot « non-irradié » (nos. 15, 16, 17, 18). Par contre, les *surrénales* présentent sivement des lésions d'ordre dégénératif, parfois réactives, trahissant on directe de l'irradiation. Les glandes surrénales se sont comportées qu'on pourrait s'y attendre comme un « test » de la sollicitation à laquelle nisme a été soumis par les conditions expérimentales: les surrénales été indemnes chez le lot « infecté », tous les animaux irradiés présentant réduction du volume de la couche glomérulaire, associée — chez le lot

« infecté-irradié » — à l'hyperplasie dela zone fasciculaire avec des îlots de cellules éosinophiles dans la médullaire.

Nous mentionnons que l'indemnité de l'hématopoïèse de la moelle sternale ne nous semble pas, dans nos conditions de dosage, totalement invraisemblable.

L'étude comparative de la réponse en anticorps de l'infection provoquée entre le lot irradié et celui non-irradié a montré des différences de réaction relativement petites. Ces différences ne permettent pas d'affirmer que l'irradiation pourrait exercer une influence remarquable sur la capacité de réaction immunologique des animaux.

Nous ne sommes pas en possesion des données qui nous permettent d'affirmer que la conservation de la réactivité immunologique humorale serait due au fait que l'irradiation — effectuée dans nos conditions — n'a pas produit d'altérations dans toutes les étapes du processus formateur d'anticorps. En plus, il faut tenir compte de l'intervention de deux autres facteurs: d'une part, à cause de l'espèce microbienne nous ne pouvons considérer que la réaction des anticorps constitue une réponse primaire; d'autre part, le fait d'avoir travaillé avec des germes vivants, qui ont offert aux animaux un stimulus antigénique continu.

De même, on n'a pas pu établir des corrélations entre la mortalité et le titre maximum des anticorps, leur persistance, la promptitude de la réaction des anticorps, le quantum du dernier titre précédant l'exitus de l'animal et les différentes oscillations du titre pendant la durée de l'expérience. Afin d'illustrer cette situation, l'exemple de l'animal no. 3 — l'unique survivant du lot « irradié-infecté » — est suffisant. Seize jours après l'infection, cet animal est à ce moment le seul — des dix survivants — qui ne dépasse pas la limite initiale du titre de l'antistaphylolysine α; 28 jours après l'infection, le même lapin est le seul à présenter un titre de 0,5 U.A./ml d'antistaphylolysine α, alors que tous les autres animaux avaient dépassé ou atteint 2 U.A./ml déjà à partir du 21-e jour. Tous ces faits prouvent que — au moins dans nos conditions de travail — les anticorps humoraux testés n'ont eu aucun rôle dans la survie des animaux, ne représentant tout au plus que des indices de leur réactivité.

Les résultats des examens hématologiques sont discutés en particulier du point de vue « indice » de l'action de l'irradiation et du « test » de la réactivité. L'examen du leucogramme prouve que la radiation ionisante — appliquée dans nos conditions — a provoqué, dans 10 cas sur 12, une baisse de la courbe leucocytaire, allant jusqu'à la leucopénie. Toutefois, on n'a pas pu établir de corrélation entre la leucopénie et la mort des animaux, vu que la radiation ionisante appliquée a été incapable de provoquer des altérations organiques irréversibles des éléments myélopoïétiques et que la baisse des courbes leucocytaires précédant l'infection pourrait être atribuée plutôt à des modifications d'ordre fonctionnel, hypothèse à laquelle s'ajoute la conservation de l'intégrité des mitoses hématopoïétiques de la mœlle sternale.

Cependant, pour justifier la leucopénie, en plus de l'inhibition de la myélopoïèse, on pourait invoquer aussi le rythme accru de la destruction des leucocytes dans l'organisme irradié, par la libération de toxines élaborées pendant l'irradiation. Les modifications procentuelles des éléments figurés, après l'infection, du lot « non-irradié » reflètent selon toute probabilité le processus déterminé

r l'infection expérimentale; toutefois l'intensité a été plus réduite que celle ésumée, surtout en ce qui concerne l'amphophilie réalisée (revenant, peut-re, — du moins dans certains cas — à la réaction monocytaire). Chez le lot non-infecté », les modifications procentuelles du leucogramme pourraient réter soit l'action de la radiation ionisante sur les éléments monocellulaires, it l'infection secondaire, ou peut-être les deux. Nous inclinons vers cette dernière pothèse, vu que les modifications dans ce lot sont nettement plus évidentes e dans le lot non-irradié; remarquons toutefois que dans ce cas elles auraient être encore plus marquées chez le lot « irradié-infecté », ce qui ne s'est pas duit. Quant à la réaction des monocytes dans les lots infectés, il nous paraît rtain que l'infection expérimentale a joué un rôle prépondérant dans ses mani-tations périphériques, vu que chez le lot non-infecté elle n'a été constatée e chez deux animaux et encore dans une mesure relativement réduite et de rsistence moindre. Cette réaction monocytaire pourrait être mise en corréla-n avec la présence des éléments sphéro-cellulaires (lymphocytes, polyblastes, tiocytes), en particulier dans les exsudats et les infiltrations inflammatoires lots infectés, étant donné la plasticité évolutive remarquable de ces éléments. utefois, les raisons profondes de cette réaction monocytaire restent un pro-me non-élucidé. Pour l'instant, nous manquons d'indices qui nous permettent maginer une manière "sui generis" de réagir des animaux envers l'infection c un germe pyogène, et nous sommes plutôt tentés de considérer que l'infec-n expérimentale n'a été qu'un élément qui a déclanché une réaction « préparée vance » par certaines infections spontanées (éventuellement des viroses).

Avant de conclure, nous jugeons utile de présenter quelques considérations cernant les causes générales de la mortalité des animaux. La coexistence la survie avec des tableaux histopathologiques complexes et des aspects des ons parfois graves, d'une part, et la mort spontanée de quelques animaux sentant des lésions d'intensité modérée étendues seulement dans certains anes ou des lésions graves seulement dans un ou deux organes avec indem-partielle des autres, d'autre part, soulève une série de problèmes qu'on t énoncer sous la forme d'hypothèses interprétatives, notamment:

— le temps nécessaire à la formation de lésions anatomo-pathologiques les et profondes;

— un degré de hyporéactivité générale ou limitée à certains organes ou èmes;

— le rôle plus ou moins prépondérent qu'une lésion grave dans un certain ne pourrait jouer dans l'atteinte ultérieure du reste des organes ou dans ort rapide de l'animal.

En considérant que le « jeu » de ces trois éléments ainsi que leur interfé-e peuvent constituer des facteurs qui expliquent nos observations sur les aux succombés spontanément au cours de nos expériences, nous pourrions per les principaux aspects généraux comme suit: dans quelques cas (nos. 17 8 du lot « non-irradié »), l'hypothèse du temps nécessaire à la formation sions paraît avoir le pas sur les autres, fait démontré tant par les tableaux pathologiques, que par les données immunologiques et hématologiques. ; d'autres cas (nos. 11 et 12, et en grande partie le no. 9 du lot non-infecté même les nos. 5 et 6 du lot irradié-infecté), nous ne pouvons refuter aucune rois hypothèses, vu la gravité des lésions constatées dans certains organes,

la résistance du reste des organes et l'existence de quelques indices de réactivité tissulaire, immunologique ou hématologique. Enfin, dans un autre cas (le no. 4 du lot « irradié-infecté ») il semble que le problème du temps nécessaire à la constitution des lésions et l'hypothèse d'une hyporéactivité partielle, doivent être pris en considération vu l'absence de lésions particulièrement graves ainsi que l'aréactivité immunologique et — partiellement — hématologique observées.

CONCLUSIONS

Dans la présente étude, on a examiné certains aspects du rôle de la radiation ionisante, administrée pendant 44 jours en doses de 50 r, à 3—4 jours d'intervalle, dans l'infection expérimentale des lapins avec le *Staphylococcus aureus* pathogène.

Les expériences ont été effectuées sur 18 lapines Chinchilla, réparties en trois lots de 6 animaux chacun, le premier lot étant irradié et infecté, le second infecté et le troisième irradié sans être infecté. Les premiers deux lots ont servi de témoins.

On a effectué les déterminations suivantes: leucogramme, courbe pondérale, titre des agglutinines et de l'antistaphylolysine, examen anatomo-pathologique.

Les animaux survivants ont été sacrifiés 90 jours à partir de l'infection.

On a fait des cultures en vue d'isoler des animaux la souche infectante étudiant les souches obtenues comparativement à la souche initiale.

Les résultats de ces études ont été les suivants:

— la mortalité des animaux a été supérieure dans le lot « irradié-infecté » (5 animaux sur 6) par rapport aux lots infectés (2 animaux sur 6). Le lot irradié a présenté une mortalité intermédiaire (3 animaux sur 6);

— les données hématologiques ont montré que l'irradiation a provoqué la baisse du nombre des leucocytes par ml., mais n'a pas réussi a inhiber la réaction leucocytaire vis-à-vis de l'infection; de ce point de vue on n'a pas observé des différences significatives entre les deux lots infectés. En fait, même le lot irradié-non-infecté a permis d'entrevoir la manifestation de certaines réactions leucocytaires chez deux animaux — probablement envers l'infection endogène ou de redressement. La modification du rapport granulocytes amphophiles/lymphocytes, en faveur des premières s'est manifestée dans tous les lots, le décalage étant plus marqué chez le lot irradié-non-infecté. A l'infection expérimentale, les deux lots ont réagi par une monocytose dont nous n'avons pu déterminer la genèse;

— les données immunologiques révélent des différences relativement peu signifiantes entre les réactions envers l'infection provoquée des deux lots, ce qui ne nous permet pas d'affirmer que, dans nos conditions, la radiation ionisante aurait eu une influence fondamentale sur la réactivité immunologique;

— les examens histopathologiques ont mis en évidence des lésions en général plus graves chez le lot irradié-infecté par rapport à celui infecté-non-irradié. Le lot irradié-non-infecté a présenté, de certain point de vue, un tableau histologique à caractère intermédiaire;

— le problème de la corrélation entre les résultats de nos déterminations la proportion ou l'ordre chronologique de la mortalité n'a pas trouvé en grande rtie sa solution, étant donné la large échelle de degrés de réactivité individuelle ésentée par les animaux sous tous les aspects étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

Taliaferro W. H. et Taliaferro L. G. — J. Immunol., 1959, **66,** 181
Talmage D. W. — Annual Rev. Microb., 1955, **9,** 335
Miller Ph. — Ann N. Y. Ac. Sc., 1956, **66,** 280
Berlogea I., Schonfeld S. et Strati I. — Rev. Sanit. Militară, 1959, 155
Troitki V. L. et Tumanina M. A. — Trud. Parv. Zakavk. Conf. Med. Radiol, 1956, 75
Coursaget J. et Gaude G. — Rev. franc. Clin. Biol., 1956, **1,** 643
Saslaw S. et Carlisie H. N. — J. Lab. Clin. Med., 1959, **53,** 896
Taliaferro W. H. et Taliaferro L. G. — J. Inf. Dis, 1957, **101,** 85
Gvik K. et Marcus S. — J. Immunol, 1957, **79,** 312
Perkins E. H. et Marcus S. — J. Immunol., 1958, **79,** 300
Djikidze E. K. et Aksenoza A. S. — Mediț. Radiol., 1959, no. 4, 44
Kiselev P. N. et Buzini P. A. — Probl. act. Immunoll, Leningrad, 1959
Vaiznikovțeva G. N. — Voprosî virusol., 1959, no. 1, 50
Hammond C. W., Anderle S. K. et Miller Ph. C.: Rad. Research, 1959, **11,** 242
Krebs J. S., Brauer R. W. et Kalbach H. — Rad. Research, 1959, **10,** 80
Andrews H. L. — Rad. Research, 1960, **12,** 195
Cekatilo G. A. — Mediț. Raidol., 1959, no. 2, 37

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ИОНИЗИРУЮЩИХ ОБЛУЧЕНИЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ ПАТОГЕННЫМИ СТАФИЛЛОКОККАМИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы исследовали некоторые аспекты роли, которую играют ионизирующие лучения, назначаемые в форме фракционированных доз в 50 R. каждая, до общей ы 650 R. при экспериментальной инфекции кроликов, вызванной патогенными ста-лококками. Смертность среди зараженных и облученных животных была больше среди контрольных животных.

Было отмечено снижение числа лейкоцитов у облученных животных; лейко-арная реакция в отношении инфекции наблюдалась однако как среди необлу-ых, так и среди облученных животных. У зараженных животных (облученных необлученных) отмечалась также и моноцитарная реакция.

Наблюдались сравнительно небольшие различия в гуморальной иммунологи-ой реактивности между облученными и зараженными животными по сравнению раженными необлученными контрольными животными.

Патогистологические поражения у животных, подвергшихся облучению и жению, были более тяжелыми, чем у контрольных животных.

Вопрос соотношений между фактами, установленными авторами и процентом же степенью смертности животных остается открытым, ввиду наличия широкой ы индивидуальных различий реактивности подопытных животных со всех енных точек зрения.

UNTERSUCHUNGEN UBER DIE ROLLE IONISIERENDER STRAHLEN BEI DER EXPERIMENTELLEN INFEKTION MIT PATHOGENEN STAPHYLOKOKKEN

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden einige Aspekte der Rolle ionisierender Strahlen bei der experimentellen Infektion von Kaninchen mit pathogenen Staphylokokken untersucht. Verabreicht wurde eine Gesamt dosis von 650 r in mehreren Bestrahlungen (50 r).

Die Letalität war bei den bestrahlten und infizierten Tieren höher als bei den Kontrollen.

Bei den bestrahlten Tieren wurde eine Abnahme der Leukozytenanzahl verzeichnet, doch trat sowohl bei den nicht bestrahlten als auch bei den bestrahlten Tieren eine leukozytäre Reaktion auf die Infektion ein. Die (bestrahlten oder nicht bestrahlten) infizierten Tiere wiesen auch eine monozytäre Reaktion auf.

Zwischen den bestrahlten und infizierten Tieren und den nicht bestrahlten und infizierten Kontrollen wurden verhältnismässig geringe Unterschiede der humoralen immunologischen Reaktionen verzeichnet.

Bei der bestrahlten und infizierten Gruppe traten schwerere histopathologische Schäden auf als bei den nicht bestrahlten Kontrolltieren.

Das Problem der Korrelation zwischen unseren Feststellungen und dem Prozentsatz sowie der Reihenfolge der Todesfälle muss offen bleiben, da die Tiere ein breites Spektrum individueller Reaktionsweisen hinsichtlich aller untersuchten Veränderungen aufwiesen.

INVESTIGATIONS CONCERNING THE PART PLAYED BY IONIZING RADIATION IN EXPERIMENTAL INFECTION WITH PATHOGENIC STAPHYLOCOCCI

SUMMARY

Some aspects of the part played by ionizing radiation in the experimental infection of rabbits with pathogenic staphylococci have been investigated. Irradiation was performed by administering a total dose of 650 r in fractions of 50 r each.

The death rate in irradiated and infected animals was higher than in the controls. A decrease of the number of leukocytes was recorded in the irradiated animals. However, the leukocytic reaction to infection was present both in non-irradiated and in irradiated animals. The infected animals (irradiated or not) moreover displayed a monocytic reaction.

Comparatively small differences of humoral immunological responsiveness were found to exist between irradiated and infected animals and infected non-irradiated controls.

The histopathological lesions were more severe in the irradiated and infected group than in the controls.

The animals displayed a wide range of variation in individual responsiveness as regards all the aspects investigated. The correlation between the findings of the authors and the percentage rate and succession of fatality must hence be considered as an open problem.

E CARACTÈRE DE L'ENDÉMIE PALUSTRE ET L'EFFICIENCE ES MÉTHODES D'ÉRADICATION APPLIQUÉES DANS UNE RÉGION ENDÉMIQUE DE LA ZONE TROPICALE

par

I. Spînu, M. Smolinschi et Maria Atanasiu
en collaboration avec
Le van Uoc, Vu phi Hung, Ho van Huu, Do duc Tuy et Simona Petresco

Travail du Ministère de la Santé et des Prévoyances Sociales, Direction Générale Sanitaire Antiépidémique, de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de Parasitologie et de l'Institut de Parasitologie de Hanoï).

— Manuscrit reçu le 24 mai 1961 —

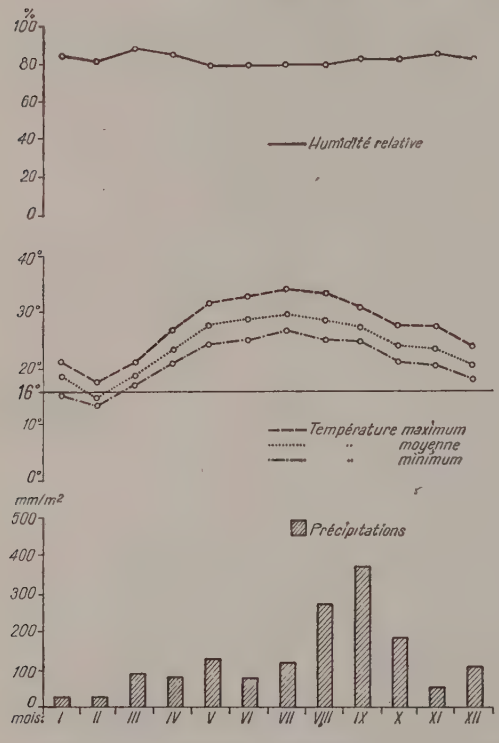
Le paludisme constitue dans la République Démocratique du Viet-Nam u des principaux problèmes de santé publique, problème inclu, pour son adication, dans le plan d'état de perspective.

Etant donné les particularités biologiques du vecteur majeur de la malaria, tte maladie est répandue dans toute la zone des montagnes et des régions us-montagneuses, qui représentent plus de deux tiers du territoire du pays.

L'objet principal de nos recherches était l'étude de l'endémie palustre et n évolution par rapport aux actions d'éradication entreprises, ainsi que l'étude s facteurs locaux dont dépend l'épidémiologie du paludisme dans la zone spective — et par extension dans toute la partie sud du pays — en vue l'élaboration d'un plan national d'éradication du paludisme.

Avant d'analyser les résultats de nos recherches, nous considérons utile exposer quelques données succintes concernant la situation oro-hydrographique, matologique et démographique de la zone. Celle-ci est caractérisée, dans la rtie sud par un série de mamelons peu élevés, variant entre 25—100 m, couverts d'une végétation naine et rare. Les canaux d'irrigation qui entourent base des mamelons représentent les seuls gîtes larvaires de ce territoire, rela- ement pauvre en eau. Vers le Nord, la zone des mamelons passe brusquement une zone d'altitudes assez grandes, couvertes de forêts, sillonnées par des vallées fondes, avec de nombreux ruisseaux. Du point de vue climatologique, une ude, basée sur les données des dernières 17 années, nous a montré que la mpérature mensuelle moyenne n'a baissé que pendant certaines années au ssous de 16°, et dans ces cas exclusivement pendant le mois de février, rsqu'elle oscille entre 15,2°—16°. En ce qui concerne les températures maxima, es sont enregistrées dans l'intervalle juin-août, ne dépassant pas 35°; les nima ne descendent pas au dessous de 14° et sont généralement enregistrées ndant les mois de janvier et février. (Graphiques 1 et 2).

En ce qui concerne le régime des précipitations, la plus grande quantité de pluie est enregistrée pendant les mois d'août et septembre (267,2—364 mm/m² par mois), variant pendant 24 heures entre 118,2—131,2 mm. La quantité de pluie la plus réduite tombe dans l'intervalle octobre—novembre.



Graphique 1. — Données climatologiques pendant les 17 dernières années.

L'humidité relative est approximativement égale pendant toute l'année, oscillant entre 81—88%.

Ainsi, on peut distinguer dans cette région deux saisons de pluie caractéristiques: la saison du « crachin », pluie à gouttes très fines, propre au mois de février — mars et la saison des averses qui se situe dans la période juillet — septembre. Tandis que pendant la période du « crachin » le développement des larves n'est pas entravé, pendant l'époque des pluies torentielles les gîtes larvaires sont détruits par la hausse rapide du niveau et la crue du débit des eaux.

L'occupation principale de la population est constituée par la riziculture, l'élevage du bétail et l'exploitation des forêts. A remarquer que les habitants s'occupant des exploitations forestières ont l'habitude de demeurer pendant un temps assez long dans la forêt (10—15 jours). De même, des groupes de population se déplacent vers la zone montagneuse ou vers la plaine, afin de travailler sur divers chantiers.

La population habite dans des petits hameaux dispersés, difficilement abordables, formés de 25—30 cases, en moyenne avec 100—300 habitants.

L'habitation-type s'élève sur des pilotis, la partie supérieure servant d'habitation, celle inférieure d'étable pour les bœufs, les buffles et les porcs. Les maisons ont les parois formées par un tréillis de bambou; le toit est en feuilles de latanier.

Afin de réaliser les objectifs proposés, nous avons choisi, pour nos études, un certain nombre de hameaux, situés dans des zones à caractéristiques oro-hydrographiques et démographiques différentes. La population de ces hameaux, étudiée périodiquement par des investigations paludométriques (y compris la

thermométrisation) hebdomadaires, bi-mensuelles ou avant et après les opérations imagocides, représente 13,4% de la population de la zone étudiée; le reste des habitants a été soumis à une surveillance active et passive.

Un premier problème abordé, en vue de concrétiser un programme de dépistage et d'observation pendant la campagne d'éradication, a été constitué par la détermination de la proportion des cas fébriles dus au paludisme, en diverses circonstances.

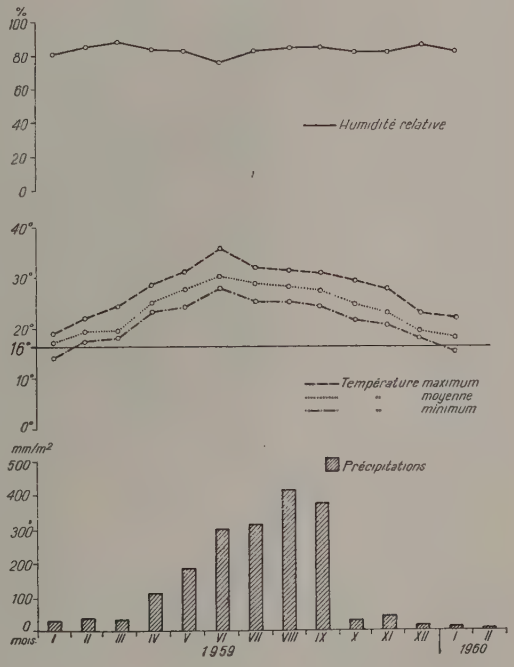
Les données de la littérature de spécialité à ce sujet sont très variables, étant en stricte relation avec deux facteurs:

a) la fréquence globale du paludisme dans la zone respective;

b) la fréquence générale de la fièvre due à d'autres causes.

Ainsi, le Bureau Sanitaire Panaméricain, estime le taux de la population fébrile à 10%; le Bureau Régional de l'O.M.S. indique, pour l'Inde, dans les zones à transmission interrompue, une proportion de 2% de la population qui présente de la fièvre au cours d'une année.

L'analyse des premières recherches effectuées dans la zone expérimentale a démontré l'existence d'un pourcentage élevé de fébriles (35,5% à 50,7%), à l'exception de la localité Pho Cong où la proportion n'a pas dépassé 19,5%, ce hameau ayant subi l'influence des mesures antipaludiques instituées déjà en 1958.



Graphique 2. – Données climatologiques 1959—1960.

La fièvre présente les caractères suivants: elle est peu élevée, persistante — aux contrôles repétés — et n'est pas accompagnée par d'autres symptômes subjectifs. La thermométrisation effectuée à différentes heures de la journée, sur les mêmes lots, montre que la plus grande proportion de fébriles apparaît entre 11—13 heures. Cette fièvre cède assez difficilement à la médication antipaludique, de sorte que le pourcentage des fébriles reste élevé même lorsque les indices parasitaires tombent à zero. Ainsi, nous pouvons citer comme exemple quelques hameaux où, malgré l'absence de cas confirmés, la proportion des fébriles oscille entre 10,7—34,8% (le hameau Trung Minh), 8,1—31,9% (le hameau Tan Thanh) et 12,5—32,9% (le hameau Cao Hoa). Après 10 mois d'action antipaludique, le pourcentage des fébriles continue à se maintenir entre 6,2—16,1%

Analysant la répartition des fébriles par groupes d'âge, on constate une incidence plus élevée dans le groupe de 0—15 ans, suivie par le groupe de 15—25 ans. Toutefois, on remarque dans les hameaux Trung Minh et Thuong Son une répartition égale des fébriles par rapport aux groupes d'âge.

Quant à la proportion des cas fébriles, dus exclusivement au paludisme, celle-ci varie selon les auteurs. Ainsi, dans un district d'Afghanistan, à transmission résiduelle, 15,3% des personnes fébriles dépistées ont été confirmées par l'examen hématologique. Gramiccia, au cours des recherches faites en Irak, constate que 30% des personnes qui accusaient de la fièvre ont été confirmées comme ayant la malaria.

Nos recherches initiales, effectuées à ce sujet dans les localités étudiées, ont montré que du nombre total des fébriles, 25—40% en moyenne, ont été confirmés comme paludiques, à l'exception des localités Trung Minh et Thuong Son où la proportion est plus élevée (55—63%). A la suite des mesures d'éradication appliquées, le pourcentage des cas fébriles confirmés comme paludiques n'a pas dépassé 15%, chiffre qui concorde avec celui donné par Yekutiel (5—20%) pour les zones soumises à l'éradication, mais avant l'arrêt complet de la transmission de la maladie.

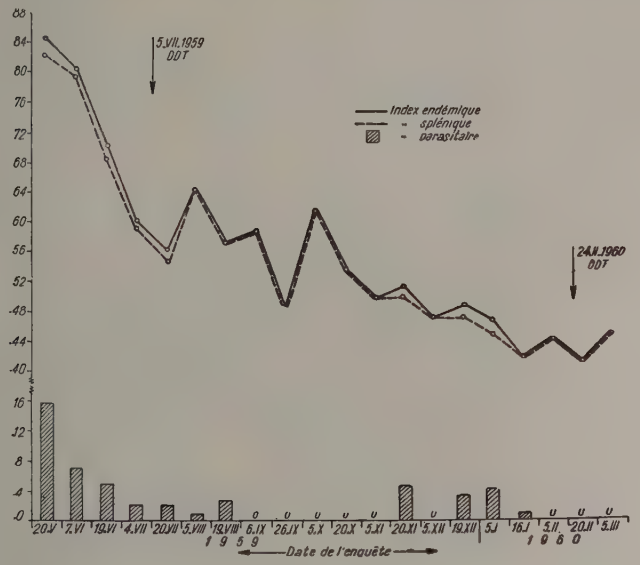
L'analyse des indices parasitaires des hameaux expérimentaux permet l'observation de variations appréciables même pour les localités voisines, fait d'ailleurs signalé dès 1911 par Mathis et Leger, qui insistent sur « l'inégalité de la répartition de l'endémie palustre, non seulement par régions, mais aussi par localités ». L'explication de ces constatations est fournie par deux facteurs variables pour chaque localité: le facteur qualitatif représenté par la biologie et la spécificité des vecteurs et le facteur quantitatif, exprimé par l'abondance, le voisinage et la permanence des gîtes larvaires.

Afin d'illustrer ces assertions, nous pouvons citer deux localités, situées sur les rives des ruisseaux, constituant des gîtes larvaires très favorables pour *A. minimus*, vecteur principal du paludisme dans la zone montagneuse. Dans le hameau Trung Minh avec un indice parasitaire de 15,4%, *A. minimus* se trouve dans un pourcentage de 62,3%, tandis que dans le hameau Thuong Son, où l'indice parasitaire est 26,6%, cette espèce apparaît dans un pourcentage de 81,4%.

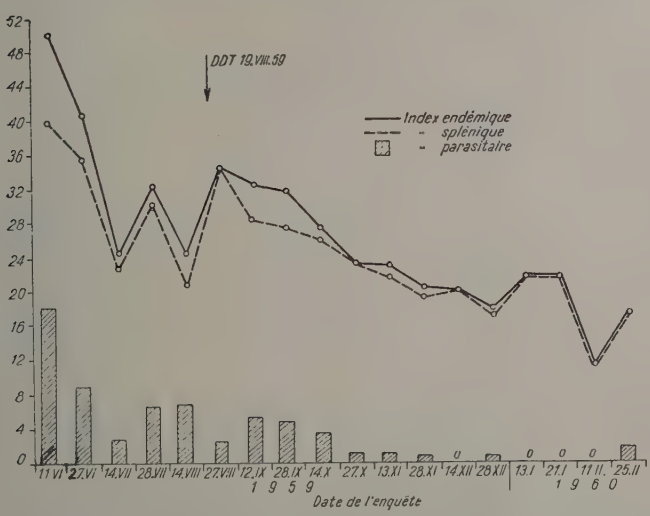
Par contre, dans la localité Cao Lan, avec un indice parasitaire de 5,9%, *A. minimus* ne se trouve qu'en proportion de 12,6%, à cause des conditions peu favorables pour les gîtes larvaires de cette espèce.

Les indices parasitaires, par groupe d'âge, montrent que le groupe compris entre 0—4 ans est impaludé dans une proportion de 66%, le groupe de 5—8 ans jusqu'à 50%, tandis que dans le groupe de 9—15 ans le taux varie entre 27—40%. Proportionnellement, à un âge plus avancé, nous assistons à la régression des indices parasitaires en même temps que l'apparition de l'état de prémunition qui caractérise la population adulte, de sorte que, chez le groupe dépassant 50 ans, la proportion des cas de paludisme ne dépasse pas 10%. Ainsi, on constate que dans la zone étudiée l'infection paludique se produit au cours de la première enfance, ce qui nous permet de considérer une partie de ce territoire comme hyperendémique.

L'incidence des différentes espèces de *Plasmodium* a été la suivante: *P. falciparum* — 78,1%, *P. vivax* — 18,5% et *P. malariae* — 2,1%; les infections associées ont représenté 0,6%.



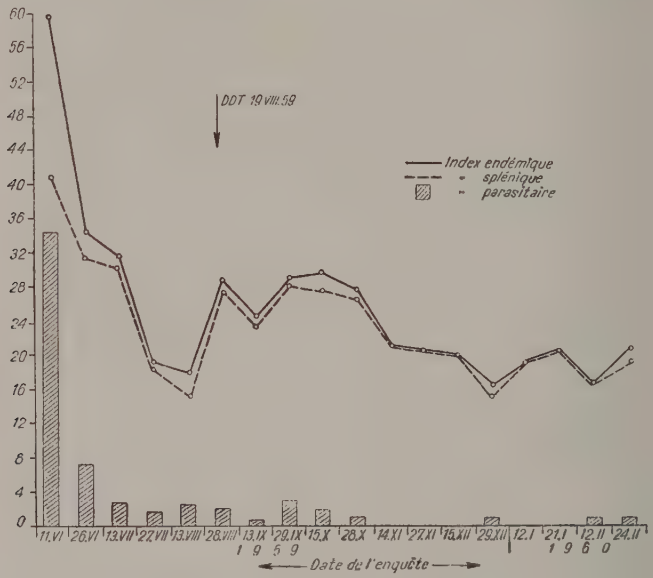
Graphique 3. — Hameau de Trung Minh. Evolution de l'index endémique, splénique et parasitarie. Insecticide utilisé: D.D.T. 2 g/m². Thérapie antipaludique: chloroquine + pyriméthamine.



Graphique 4. — Hameau de Phu Xuan. Evolution de l'index endémique, splénique et parasitaire. Insecticide utilisé: D.D.T. 2 g/m². Thérapie antipaludique: acriquine + plasmocide.

L'examen microscopique décèle dans la majorité des cas l'existence d'une infection paludique ancienne, souvent incomplètement traitée. La parasitémie est réduite et les parasites déformés, de sorte que pour la plupart des cas le diagnostic hématologique ne peut être établi que sur les restes de pigment paludéen.

L'étude de la fréquence des gamétophores dans la zone examinée démontre une proportion de 18,1—83,9%, fournie en particulier par le groupe d'âge de

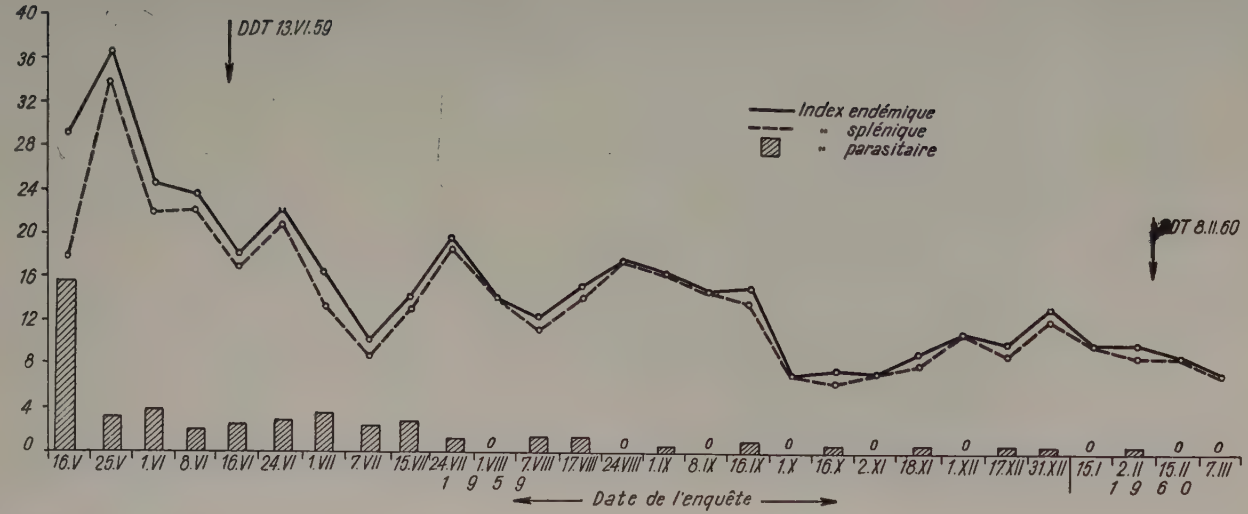


Graphique 5. — Hameau de Tan Thanh. Évolution de l'index endémique, splénique et parasitaire. Insecticide utilisé: D. D.T. 2 g/m². Thérapie antipaludique: chloroquine + pyriméthamine.

26—50 ans. Ces données sont comparables aux résultats obtenus par EARLE, dans une étude faite sur la population de Porto-Rico, démontrant que 20—50% des lames positives contenaient des gamétocytes. Quant à la fréquence des gamétophores des différentes espèces de *Plasmodium*, on a constaté que parmi les cas dus au *P. falciparum*, 25% étaient porteurs de gamétocytes, tandis que du nombre total des cas avec *P. vivax*, 35% présentaient des gamétocytes aux examens hématologiques.

Il faut toutefois souligner que pour certaines localités (Tan Thanh et Phu Xuan) le nombre de gamétophores de *P. vivax*, rapporté au nombre des cas de malaria dus à cette espèce, donne de plus grandes proportions, oscillant entre 42 -66%, chiffre presque identique à ceux obtenus par PARROT, CATANEI et AMBIALET, au cours des observations faites en Algérie, où 43% des frottis avec *P. vivax* présentaient des gamétocytes.

Les splénométries effectuées périodiquement dans la zone expérimentale ont montré des variations fréquentes des dimensions des rates, fait observé



Graphique 6. — Hameau de Cao Hoa. Evolution de l'index endémique, splénique et parasitaire. Insecticide utilisé: D.D.T. 2 g/m². Thérapie antipaludique: chloroquine + pyriméthamine

d'ailleurs aussi par d'autres auteurs (Hill). Nous-mêmes avons également constaté des modifications survenant d'une semaine à l'autre, les infections avec *P. falciparum* exerçant une influence plus marquée sur l'hypertrophie splénique. En général, les indices spléniques ont oscillé entre les limites de 18,1—83,9%. Le grand nombre de splénomégalies du IV-e et V-e degré confirme le caractère grave de l'endémie. Ainsi, dans les hameaux Trung Minh et Thuong Son, la proportion des splénomégalies du IV-e et V-e degré a été de 34%, respectivement 26%. Quant à l'indice de la rate moyenne hypertrophiée, on a constaté une variation allant de 1,5 à 2,9. Afin de préciser le caractère de l'endémie, on a également déterminé l'indice endémique (Ross), qui a oscillé entre les limites de 28,3—84,5%.

Basés sur les indices parasitaires et spléniques, ainsi que sur les caractéristiques oro-hydrographiques, nous avons divisé le territoire étudié en deux zones distinctes:

1. La zone du Sud, à conditions peu favorables au développement de l'espèce *A. minimus* et qui représente une zone d'endémie modérée avec des indices parasitaires totaux entre 5—10% et spléniques qui ne dépassent pas 10—25%.

2. La zone du Nord, favorable au développement de *A. minimus* par les ruisseaux existants, qui constituent de véritables gîtes larvaires et qui représente une zone hyperendémique avec un indice parasitaire dépassant 25% et indice splénique au-dessus de 50%.

Les recherches effectuées dans ce but ont permis la délimitation précise de la zone de contact entre les deux grandes zones malariologiques de la partie sud du pays: la II-e zone hypoendémique et la IV-e zone hyperendémique, qui dans cette partie du pays présentent la particularité d'un passage presque sans transition d'une zone à l'autre.

Pour l'étude de l'efficacité des mesures complexes (chimiothérapie et desanophélisation) appliquées dans le territoire expérimental, on a poursuivi périodiquement l'évolution des indices parasitaires, splénométriques et de la morbidité palustre (voir tableau I et graphiques 3, 4, 5 et 6).

Après 10 mois d'action, on observe une baisse considérable des indices parasitaires, baisse qui varie entre 80—100%, alors que la diminution des indices spléniques se fait dans un rythme plus lent (seulement 50%) à l'exception des localités Xom Lieu et Thuong Son où elle est encore moins marquée (20 — 22,7%), raison pour laquelle l'indice de la rate moyenne hypertrophiée se maintient encore entre 1,1 — 1,8%. En ce qui concerne l'indice endémique, on constate des valeurs réduites, oscillant entre 18—46%.

L'évolution des indices parasitaires par groupes d'âge montre une diminution en particulier chez le groupe de 0—8 ans, leur diminution dans les autres groupes d'âge se faisant dans un rythme plus lent à cause des rechutes parasitaires des infections palustres anciennes, dépistées successivement par les examens périodiques.

Quant à la morbidité par la malaria, l'évolution de l'incidence des cas nouveaux dans les localités expérimentales prouve une diminution brusque du nombre des cas pendant le mois de juillet (de 151 à 36 cas), phénomène qui est la conséquence des pulvérisations commencées au mois de juin. Cette diminution continue pendant les mois suivants, de sorte qu'on n'enregistre plus le second apex de l'incidence, qui habituellement fait son apparition pendant les mois de

novembre—décembre. L'absence de cet apex constitue un argument en plus pour l'efficacité de la méthode imagocide dans la zone étudiée. Enfin, la disparition des infections nouvelles chez le groupe d'âge de 0—8 ans, à partir du mois d'août, constitue une preuve de plus pour l'efficacité des desanophélisations.

Tableau I

Résultats des investigations paludométriques effectuées avant l'action d'éradication et après 10 mois d'activité

Hameau	Indices parasitaires		Indices spléniques		Rate hypertrophiée (moyenne)		Indices endémiques	
	A	P	A	P	A	P	A	P
Cao Lan	13,4	1,4	24,8	17,03	1,6	1,4	28,6	17,6
Cao Hoa	15,9	0	18,1	9,18	1,5	1,3	29,3	9,18
Pho Cong	8,5	0	23,8	12,9	2,03	1,8	28,3	12,9
Trung Minh	15,4	0	82,9	41,9	2,9	1,6	84,5	41,9
Thuong Son	26,6	4,4	75,2	58,6	2,5	1,8	80,0	63,0
Xom Lieu	23,2	1,5	55,8	44,4	2,2	1,6	66,2	46,03
Phu Xuan	18,3	1,5	39,8	17,2	1,5	1,2	49,6	17,2
Tan Thanh	34,4	0	41,3	19,6	2,1	1,1	59,4	20,1

Légende: A = première investigation (avant l'action d'éradication)
P = dernière investigation (après l'action d'éradication)

Afin d'obtenir une évaluation plus exacte de l'efficacité des desanophélisations on a effectué, en plus, des investigations paludométriques, avant et à un certain intervalle après cette opération, dans 21 hameaux situés à différents points de la zone étudiée. Les résultats obtenus sont similaires à ceux fournis par les autres localités expérimentales, ainsi qu' on peut l'observer des exemples cités dans le tableau II.

En même temps que les enquêtes pratiquées après la pulvérisation, on a effectué des recherches paludométriques dans deux hameaux — témoins — situés en dehors de la zone désanophélisée et qui présentaient les mêmes caractères oro-hydrographiques et épidémiologiques. Les résultats ont été les suivants: pour le hameau Trai un indice parasitaire de 14,1% et splénique de 31,5% et pour le hameau Moc un indice parasitaire de 16,6% et splénique de 41,2%. Les indices endémiques ont été de 36 respectivement 75%. Les résultats obtenus, comparés aux données des autres localités soumises aux opérations imagocides (tableau II), prouvent une fois de plus l'efficacité des méthodes utilisées sur le territoire expérimental.

L'étude de l'anophélisme a été fait dans les mêmes localités expérimentales et avec la même périodicité que les investigations paludométriques.

Tableau II

Résultats des investigations paludométriques effectuées avant et après la désanophélisation

Hameau	Indices parasitaires		Indices spléniques		Rate hypertrophiée (moyenne)		Indices endémiques	
	A	P	A	P	A	P	A	P
Thinh Vuonh	19,2	0,7	25,1	9,2	1,6	1,4	37,03	9,2
Xom Ha	18,6	5,03	28,8	25,1	2,0	2,08	38,9	28,7
Loc Khang	7,4	0,7	7,4	19,5	1,6	1,4	28,06	19,5
Tho Long	11,5	1,2	23,1	1,2	1,09	3,0	34,9	1,2
Tho Coc	11,7	3,6	9,8	5,4	1,6	3,3	21,5	9,09

Légende: A = avant la désanophélisation
P = après la désanophélisation

Le premier but de ces recherches a été la définition de la faune anophélienne par l'identification des espèces existantes. Pour atteindre cet objectif on a effectué des captures de jour et de nuit, les dernières à différentes heures de la nuit. On a réussi à déterminer en totalité, selon les caractères morphologiques des adultes, 7.515 anophèles, capturés pendant le jour et 3.038 exemplaires capturés pendant la nuit. A la suite des identifications on a établi sur le territoire expérimental la présence des espèces suivantes:

— Groupe *Anopheles s. stricto :* 1. *A. aitkeni James ;* 2. *A. barbirostris van der Wulp ;* 3. *A. hyrcanus var. sinensis Wiedemann.*

— Groupe *Myzomia :* 4. *A. minimus Theobald ;* 5. *A. aconitus Dönitz ;* 6. *A. jeyporiensis James.*

— Groupe *Pseudo-myzomia :* 7. *A. vagus Dönitz.*

— Groupe *Neo-myzomia :* 8. *A. tesselatus Theobald ;* 9. *A. kochi Dönitz.*

— Groupe *Neocellia :* 10. *A. karwari James ;* 11. *A. maculatus Theobald ;* 12. *A. maculipalpis var. indiensis Theobald ;* 13. *A. fulginosus Giles ;* 14. *A. philipinensis Ludlow.*

L'observation périodique des localités étudiées a permis la détermination de la fréquence des différentes espèces pendant une période de temps donnée.

On a établi que l'espèce la plus fréquente est représentée par le *A. vagus*, suivie de *A. minimus* et *A. jeyporiensis*. La présence de *A. vagus* en proportion presque similaire dans les différentes stations de capture, ainsi que dans les deux zones malariologiques, vient à l'appui de l'affirmation, qui d'ailleurs concorde avec les observations de TOUMANOFF, que cette espèce est très répandue, contrairement aux opinions de MATHIS et LEGER, qui soutiennent qu' *A. vagus* serait « moins commun dans la zone moyenne et relativement rare dans la zone montagneuse ».

En ce qui concerne l'incidence de *A. minimus*, celui-ci constitue un des plus nombreux anophèles de la zone nordique du territoire expérimental qui appartient, ainsi que nous l'avons mentionné, à la IV-zone malariologique.

A. jeyporiensis, relativement peu fréquent, est mieux représenté dans la zone du nord et assez rarement dans celle du sud.

Les autres espèces (*A. aconitus*, *A. sinensis*, *A. philipinensis*, *A. kochi*, *A. fulginosus*, *A. aitkeni* et *A. maculipalpis*) ont été trouvées en proportions réduites pendant les captures diurnes. Parmi celles-ci, *A. aconitus* ne manifeste pas de préférence spéciale pour l'une ou l'autre des zones, se trouvant en nombre presque égal sur tout le territoire examiné.

Les observations effectuées sur la fréquence des différentes espèces par rapport à une certaine période de l'année, ont montré que *A. minimus* est rare pendant la saison des pluies torrentielles — la crue du débit des rivières détruisant les gîtes larvaires de cette espèce — et, par contre assez fréquent pendant les mois de la saison sèche. Ainsi, cette espèce diminue progressivement pendant la période mai—juillet, presentant un minimum pendant ce dernier mois, pour augmenter à partir d'octobre.

La fréquence saisonnière de l'espèce *A. aconitus* est en général pareille à celle de *A. minimus*, avec le correctif que la diminution de cette espèce s'oberve moins nettement pendant la saison des pluies.

Cette même fréquence saisonnière a été également établie pour *A. jeyporiensis*, c'est-à-dire qu'elle présente un maximum pendant les derniers mois de l'année.

Des espèces du groupe *Pseudo-myzomia*, *A. vagus* se trouve en abondance dans l'intervalle août—septembre (saison des pluies), observation qui concorde avec les constatations de Mathis et Leger, confirmées par Toumanoff. La proportion la plus réduite de *A. vagus* est enregistrée dans les périodes janvier—mars et novembre—décembre. Ainsi, cette espèce se trouve moins fréquemment au cours des mois de janvier—mars, augmente progressivement en avril, atteignant un maximum en août—septembre, pour diminuer graduellement en octobre—décembre.

A. hyrcanus. var. sinensis se trouve en proportion élevée, presque identique dans l'intervalle janvier—mars, diminue en mai et se maintient à ce niveau jusqu'en août—septembre, période pendant laquelle on enregistre une baisse accentuée, suivie par une nouvelle augmentation en octobre et novembre. Cette évolution de la fréquence coïncide avec les observations de Toumanoff et seulement en partie avec celles de Mathis et Leger, qui remarquent que la fréquence de ces espèces atteint son maximum dans la période avril—juin.

Les auteurs cités ne donnent pas d'indications sur la fréquence saisonnière de l'espèce *A. barbirostris ;* Borel signale cet anophèle comme fréquent, particulièrement vers la fin de la saison des pluies et le début du « crachin ». Nos investigations entomologiques dans la zone expérimentale ont montré l'existence d'adultes de *A. barbirostris* au cours du mois d'octobre, soit à la fin de la période des averses. En concordance avec Toumanoff, nous avons également constaté que cette espèce est moins fréquente, sa capture étant laborieuse.

En ce qui concerne *A. aitkeni* et *A. maculipalpis*, ils n'ont été trouvés qu'à un seul contrôle entomologique, en exemplaires isolés, ce qui ne permet pas de tirer des conclusions sur la fréquence saisonnière de ces espèces.

Les captures effectuées pendant le jour ont permis l'identification en proportion très réduite des espèces *A. kochi*, *A. philipinensis* et *A. fuliginosus ; A. kochi* est plus fréquent au mois de septembre, étant faiblement représenté pendant

les mois de mai et d'août. *A. fuliginosus* est en plus grand nombre en septembre, diminue en juin et octobre, la proportion la plus réduite se trouvant en juin. *A. philipinensis* présente la même fréquence saisonnière.

Les observations effectuées sur les habitudes et l'habitat des anophèles de la zone expérimentale ont montré que pendant le jour ceux-ci se réfugient exclusivement dans les maisons, s'abritant de préférence sur les habits portés (suspendus au murs), sur les moustiquaires, sous les meubles (tables, lits, bancs). Ce n'est que rarement que nous avons réussi à capturer des anophèles sur les parois et alors seulement sur la partie inférieure des cloisons. Les étables, situées sous les maisons, manquant de parois latérales, n'offrent pas de conditions favorables pendant la journée pour le refuge des anophèles, de sorte qu'on ne les y a jamais trouvés, phénomène constaté aussi par TOUMANOFF.

Les densités anophéliennes moyennes sont en général très réduites, les chiffres maxima s'enregistrant dans la période juin—juillet.

Contrairement aux captures diurnes, celles de nuit ont démontré une absence quasi-totale des anophèles dans les maisons; les quelques espèces capturées pendant la nuit dans les habitations appartenaient aux espèces *A. vagus*, *A. sinensis* et *A. philipinensis*. Par contre, les investigations entomologiques nocturnes ont mis en évidence un grand nombre d'anophèles dans les étables, les espèces les plus fréquentes étant *A. philipinensis*, *A. fuliginosus* et *A. sinensis*.

Par rapport à la fréquence on a observé que: *A. fuliginosus* est rare dans l'intervalle janvier—mai et plus abondant de juin jusqu'en octobre, lorsqu'il atteint le maximum de fréquence; *A. philipinensis*, de même que *A. fuliginosus*, en nombre réduit dans les premiers mois de l'année, augmente à partir du mois de mai.

Outre les trois espèces mentionnées, on a identifié au cours des captures nocturnes faites dans les étables quelques exemplaires sporadiques de *A. vagus*, *A. jeyporiensis*, *A. kochi*, *A. aitkeni*, *A. tesselatus*, *A. maculatus* et *A. karwari*.

La fréquence des différentes espèces dans les gîtes larvaires a été étudiée par la détermination de 4.256 exemplaires de larves provenant des contrôles périodiques effectués dans les localités expérimentales. Les larves de *A. barbirostris*, *A. sinensis* et *A. aconitus* étaient les plus fréquentes.

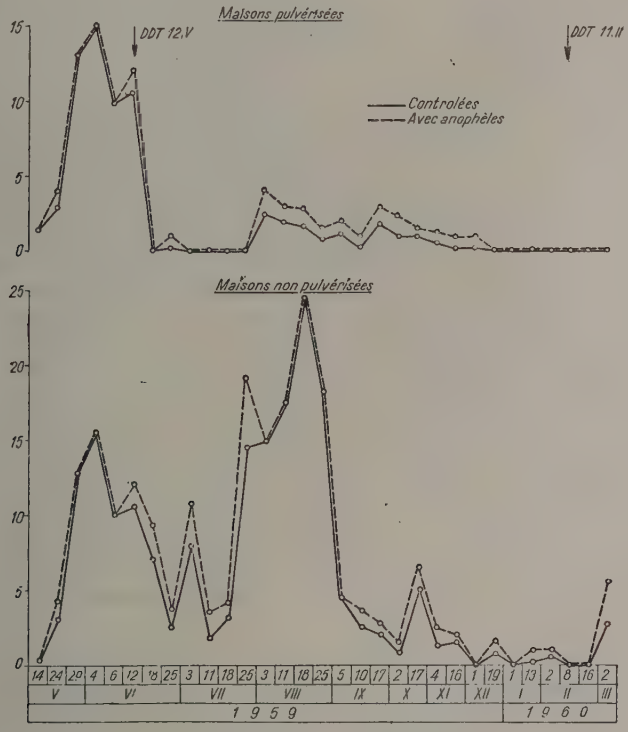
Contrairement à TOUMANOFF qui accorde la première place dans les captures aux larves de *A. sinensis* et seulement la quatrième à *A. barbirostris*, nos recherches ont démontré que, dans notre zone, cette dernière espèce se situe au premier plan, étant suivie comme ordre de fréquence par *A. sinensis*.

En ce qui concerne son évolution saisonnière, *A. barbirostris* se trouve en grande quantité dans les gîtes larvaires pendant les premiers mois de l'année (janvier—février), diminue ensuite jusqu'en juin où il présente une nouvelle augmentation, qui se maintient presque constante jusqu'à la fin de l'année.

La courbe de la fréquence des larves de *A. sinensis* est presqu'identique à celle des adultes, avec la seule différence que la baisse numérique pendant les mois d'août et septembre se produit brusquement et non graduellement. On a observé le même phénomène en ce qui concerne la fréquence saisonnière des larves de *A. aconitus*.

A l'occasion des investigations entomologiques dans la localité Thuong Son, on a observé la prédominance des larves de *A. maculatuts*, représentant 85,9% du total des larves capturées. Cette espèce est extrêmement fréquente

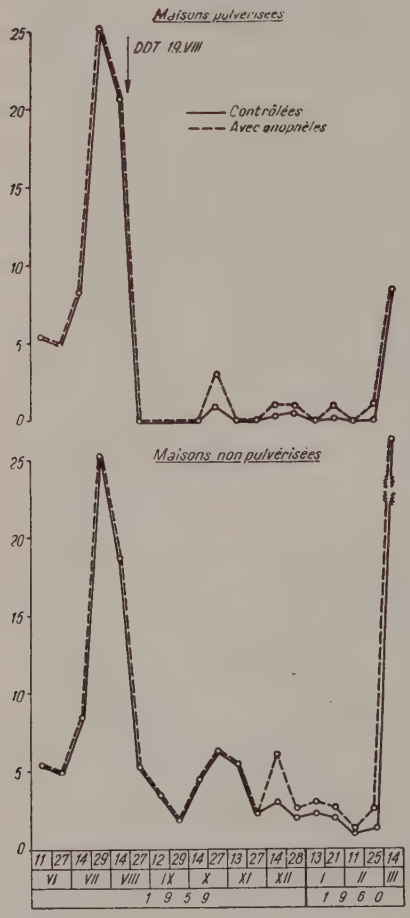
dans la période octobre—février (91,5—99,5 %) avec une diminution enregistrée pendant les mois de novembre—décembre (43,4—60,8 %). Ainsi qu'on peut facilement observer, *A. maculatus*, de même que *A. minimus*, se trouve en proportion élevée pendant la saison sèche, fait important du point de vue épidémiologique si l'on tient compte de la possibilité que *A. maculatus* peut représenter un vecteur secondaire du paludisme.


Maisons pulvérisées
DDT 12.V
DDT 11.II
Controlées
Avec anophèles
Maisons non pulvérisées
14 24 29 4 6 12 19 25 3 11 18 26 3 11 18 25 5 10 17 2 17 4 16 1 19 1 13 2 8 16 2
V VI VII VIII IX X XI XII I II III
1959
1960

Graphique 7. — Hameau de Cao Lan. Évolution de la densité anophélienne moyenne

La grande incidence des larves de *A. barbirostris* et de *A. maculatus* dans le hameau mentionné, ainsi que l'absence des adultes dans les captures faites dans les maisons, ont dirigé nos recherches vers les captures dans la nature ayant comme objectif de trouver les abris des adultes de cette dernière espèce. Les recherches effectuées périodiquement aux environs des localités n'ont pas donné de résultats, ce qui nous détermine à nous rallier à l'opinion de TOUMANOFF, qui, à la suite de mêmes résultats négatifs, est arrivé à la conclusion que ces abris se trouveraient dans la profondeur de la brousse qui entoure les habitations humaines.

L'étude de la fréquence des différentes espèces, en fonction des types de gîtes larvaires a démontré que *A. minimus* montre une préférence nette pour les eaux des ruisseaux, indifféremment de leur degré de limpidité (claires ou légèrement troubles) et de l'état des rives (couvertes ou non de végétation).



Graphique 8. — Hameau de Phu Xuan. Évolution de la densité anophélienne moyenne

Les larves de *A. aconitus* ont été rencontrées dans les mêmes types de gîtes larvaires que *A. minimus* et, en plus, dans les marécages à eau claire, fraîche. *A. vagus* se rencontre le plus fréquemment dans les marécages à eau claire avec végétation aquatique et dont les rives sont couvertes de végétation. Cette espèce a également été trouvée dans les régions inondées par les pluies, ou dans les rizières.

A. sinensis se trouve le plus fréquemment dans les marécages de dimensions réduites, dans les champs inondés ou alimentés par des infiltrations d'eau et avec végétation abondante. Cette espèce a été également rencontrée dans les rizières.

A. barbirostris montre une prédilection pour les eaux stagnantes, claires, peu profondes, avec les rives couvertes d'herbe.

A. maculatus montre une préference marquée pour les eaux des rivières claires, se trouvant sur les rives des rivières torrentielles à fond sablonneux ou rocheux.

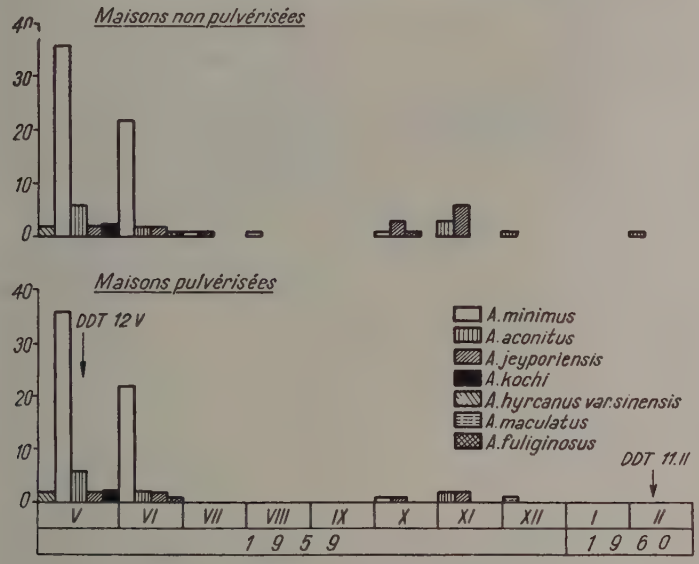
Les larves de *A. fuliginosus* ont été trouvées dans les rivières à eau claire, ainsi que dans les eaux stagnantes, claires, peu profondes avec végétation aquatique et rives herbageuses.

L'espèce *A. philipinensis* se trouve d'habitude dans les eaux peu profondes avec rives couvertes d'herbes.

Pour la détermination des vecteurs du paludisme on a effectué des recherches sur l'infection naturelle des différentes espèces, en pratiquant 4.033 dissections d'anophèles provenant de captures diurnes et nocturnes. Le résultat de ces dissections a été: deux exemplaires de *A. minimus* avec sporozoïtes (indice sporozoïtique 1,14%), 2 exemplaires de *A. vagus* (indice sporozoïtique 0,06%) et un seul exemplaire de *A. vagus* avec oocystes (indice oocystique 0,003% au mois de juillet).

L'évolution de l'indice sporozoïtique par mois a été: *A. vagus* — 0,21% en juin et 0,09% en juillet; *A. minimus* — 2,17% en mai et 1,25% en juin.

Les données obtenues permettent d'affirmer que le vecteur principal du paludisme dans la zone expérimentale est représenté par *A. minimus*, *A. vagus* pouvant être incriminé comme vecteur secondaire, fait également confirmé par TOUMANOFF. Le nombre réduit d'exemplaires disséqués appartenant aux espèces



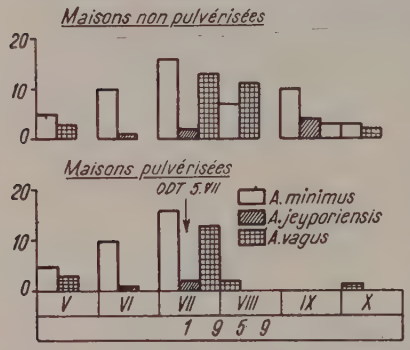
Graphique 9. Hameau Cao Lan. Captures de jour

A. aconitus, et *A. jeyporiensis*, ainsi que l'impossibilité de capturer les adultes de *A. maculatus*, n'ont pas permis la détermination du rôle dans la transmission de la malaria de ces espèces, considérées dans d'autres régions comme vecteurs secondaires.

Pour l'étude des habitudes trophiques des différentes espèces on a pratiqué la réaction de précipitation sur 314 anophèles. Ces réactions ont montré la préférence nette de l'espèce *A. minimus* pour l'hôte humain, 87% des exemplaires étudiés étant gorgés de sang humain. *A. aconitus* a été trouvé en proportion de 33,3%, *A. jeyporiensis* de 55,2% et *A. vagus* seulement en proportion de 15,7%, tous gorgés de sang humain.

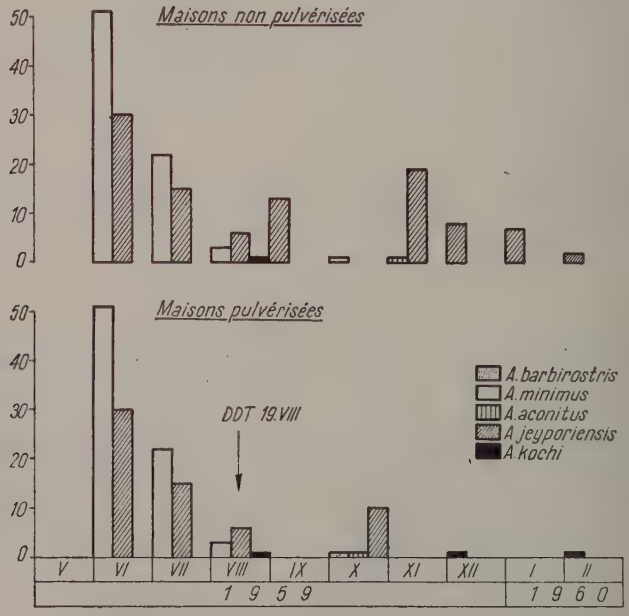
L'étude de l'efficience des pulvérisations — effectuées dans la période 12 juin — 18 août avec une solution DDT 5% en pétrole et une concentration de 2 g/m² — a été faite par l'évaluation périodique de la densité anophélienne moyenne des habitations pulvérisées, comparativement à la densité trouvée dans les maisons témoins non-pulvérisées. On a constaté qu'à la suite des désanophélisations la densité moyenne dans les maisons pulvérisées est brusquement tombée à zéro,

se maintenant presque inchangée dans les habitations témoins. La densité des habitations désanophélisées s'est maintenue pendant longtemps à zéro et même lorsqu'elle a augmenté, elle a toujours été inférieure à celle des maisons non-pulvérisées. Ainsi, dans le hameau Thoung Son, la densité anophélienne s'est maintenue à zéro pendant plus de 7 mois après la pulvérisation, tandis que dans les habitations-témoins elle a été de 7,3. De même, dans le hameau Cao Lan, la densité moyenne maximum enregistrée au moment de la pulvérisation a été de 24,5 dans les maisons non-pulvérisées, ne dépassant point 2,5 dans celles désanophélisées (graphiques 7 et 8).



Graphique 10 — Hameau Trung Minh. Captures de jour

Quant à l'effet des opérations imagocides sur les différentes espèces anophéliennes, on a observé la disparition



Graphique 11. — Hameau de Tan Thanh. Captures de jour

totale de l'espèce *A. minimus* dans les maisons désanophélisées, tandis que dans les habitations témoins celle-ci a continué à être observée (graphique 7

et 8). Le même effet a été constaté aussi sur les espèces *A. jeyporiensis* et *A. aconitus*, mais en mesure plus réduite (graphique 9).

Les résultats de ces recherches sont également confirmés par les succès obtenus en Birmanie et en Thaïlande, dans l'éradication de *A. minimus* par pulvérisation où on a enregistré une réduction spectaculaire de cette espèce dans les captures et les pêches à la suite des opérations imagocides à l'aide du DDT en dose de 2 g/m².

Afin d'apprécier la rémanence de l'insecticide on a pratiqué des tests biologiques à l'aide de cages murales sur un nombre de 4.592 anophèles capturés dans une zone non-pulvérisée.

L'analyse des résultats de ces tests montre une diminution de la rémanence en proportion de 27% dans les habitations et de 20% dans les étables, après un intervalle de 195 à 215 jours à partir de la désanophélisation.

CONCLUSIONS

Comme suite aux recherches effectuées sur les caractères de l'endémie palustre et l'efficience des méthodes d'éradication appliquées dans une région endémique de la zone tropicale, on peut tirer les suivantes conclusions préliminaires, qui doivent être confirmées par des recherches complémentaires:

1. Tenant compte des caractères oro-hydrographiques et des résultats des investigations paludométriques, le territoire étudié constitue une zone de passage entre les zones II et IV malariologiques. Ainsi, la partie sud de ce territoire est caractérisée par une faible endémie avec un indice splénique ne dépassant point 25%, tandis que dans la zone du nord ces indices sont au dessus de 50%, prouvant une forte endémicité.

2. Dans cette zone expérimentale la transmission du paludisme est temporairement interrompue au mois de janvier à cause de la température basse (atteignant certaines années —16°) et pendant la saison des pluies (juillet-août).

3. Du point de vue des manifestations cliniques du paludisme, les cas à fièvre légère et parasitémie réduite prédominent, ce qui indique la présence d'une endémie paludique ancienne dans ce territoire. La présence d'un certain nombre de sujets fébriles et splénomégaliques non-confirmés par les examens hématologiques périodiques, soulève le problème de l'existence d'autres infections non-paludiques.

4. La chute brusque du nombre des cas de paludisme à la suite des pulvérisations par le DDT prouve l'efficience des désanophélisations. En fonction de la durée de la rémanence et de la saison de transmission, les désanophélisations doivent être bi-annuelles.

5. Le vecteur principal du paludisme sur le territoire étudié est représenté par l'espèce *A. minimus*; l'espèce *A. vagus* constitue le vecteur secondaire. Etant donné la courte durée de la période des recherches, des études supplémentaires sur le rôle joué par les espèces *A. jeyporiensis*, *A. aconitus* et en particulier *A. maculatus* dans la transmission du paludisme, sont nécessaires.

6. Afin de maintenir les résultats obtenus, des mesures spéciales de protection s'imposent concernant les groupes de population qui quittent temporairement la zone pulvérisée pour d'autres zones endémiques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Dang van Ngu et Lysenko A. Y. Le paludisme et la lutte antipoludique dans le Viet-Nam du Nord, Hanoï, 1958.
2. Earle W. C., Perez M. A., Del Rio J. et coll. — J. Publ. Health, 1939, **14,** 391
3. Hill I. L., Cambournac P. et coll. — Amerc. J. Trop. Med., 1943, **23,** 147
4. Lysenko A. Y. — Med. Parazit. i Parazitarnîie Bolezni, 1959, **28,** 542
5. Mathis et Leger — Recherches de parasitologie et pathologie humaines et animales au Tonkin, Ed. Masson, Paris, 1936
6. Morin H. G. S. et Toumanoff C. — Bull. de la Soc. de Path. Exot., 1933, **26,** 83
7. Parrot L., Catanei A. et coll. — Bull. Org. Hyg. S. d. N., 1937, **6,** 683
8. Toumanoff C. — L'anophélisme en Extrême-Orient, Ed. Masson, Paris, 1936
9. Yekutiel P. — Note sur les problèmes fondamentaux d'évolution et de surveillance dans l'éradication du paludisme. OMS. Comm. d'experts du paludisme, document de travail no. 9, Lisbonne, 1958
10. Zalutkaia L. I. — Med. Parazit. i Parazitarnîie Bolezni, 1959, **28,** 548
11. Rapport de l'équipe consultative pour l'éradication du paludisme en Irak, 1957
12. Rapport de la première session du conseil de coordination antipaludique (Birmanie, Cambodge, Laos, Thailande et Viet-Nam) W.H.O. (Mal) 184, 1957
13. Rapport de la deuxième session du conseil de coordination antipaludique, W.H.O. (Mal) 195, 1958
14. Rapport de la troisième cession du conseil de coordination antipaludique, W.H.O. (Mal) 216, 1959

ОСОБЕННОСТИ МАЛЯРИЙНОЙ ЭНДЕМИИ И ДЕЙСТВЕННОСТЬ МЕТОДОВ БОРЬБЫ ПРИМЕНЕННЫХ В ОДНОЙ ТРОПИЧЕСКОЙ ЭНДЕМИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

На основании исследований, произведенных в связи с малярийной эндемией и действенностью методов борьбы с этой эндемией, примененных в одной из эндемических областей, лежащих в тропической зоне, могут быть сделаны следующие выводы:

1. Принимая во внимание орогидрографические особенности, а также результаты осуществленных малариометрических исследований, изученная территория представляет собой переходную зону между малариологическими зонами II в IV. Так, например, южная часть этой территории характеризуется маловыраженной эндемией, с селезеночными показателями, не превышающими 25%, в то время как в ее северной части эти показатели превосходят 50%, что указывает на высокую эндемичность.

2. В этой зоне передача малярии временно прекращается в январе, вследствие снижения температуры, доходящей в некоторые годы ниже 16°, а также и во время сезона сильных осадков (июль-август).

3. С точки зрения клинических проявлений малярии, среди населения преобладали случаи с небольшой температурой, и мало выраженной паразитемией, что указывает на существование имеющейся долгое время малярийной эндемии на этой территории.

Некоторое число лиц находящихся в лихорадочном состоянии, с увеличенной селезенкой, без подтверждения наличия малярии при помощи периодических гематологических исследований, ставят вопрос существования других, немалярийных инфекций.

4. Резкое снижение числа случаев малярии после осуществленных пульверизаций указывает на действенность примененных дезанофилизаций. В зависимости от продолжительности ременантного эффекта примененных препаратов, а также в зависимости от сезона передачи малярии, дезанофилизации должны производиться 2 раза в год на этой территории.

5. На обследованной территории главным переносчиком малярии является вид *A. minimus*; в качестве добавочного переносчика является вид *A. vagus*. Ввиду малой продолжительности осуществленных исследований, подлежит углубленному изучению роль видов *A. jeyporiensis*, *A. aconitus* и в особенности вида *A. maculatus* в передаче малярии.

6. Для закрепления полученных результатов должны быть приняты особые меры в отношении групп местного населения, перемещающихся из зон подвергшихся пульверизации.

DIE EIGENART DER MALARIAENDEMIE. — I. DIE WIRKSAMKEIT DER IN EINEM ENDEMIEGEBIET IN DEN TROPEN ANGEWENDETEN BEKAMPFUNGSMETHODEN

ZUSAMMENFASSUNG

Aus unseren Untersuchungen über die Malariaendemie und die zu ihrer Bekämpfung in einem Endemiegebiet der tropischen Zone angewendeten Bekämpfungsmethoden, können die nachstehenden Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. In Anbetracht seiner orohydrographischen Merkmale und der Ergebnisse malariometrischer Untersuchungen, kann das betreffende Gebiet als eine Übergangzsone zwischen den malariologischen Zonen II und IV angesprochen werden. So ist der südliche Teil dieses Gebietes durch eine leichte Endemie mit Milzindizes, die 25% nicht überschreiten gekennzeichnet, während im nördlichen Abschnitt die Milzindizes über 50% liegen, was die Hochgradigkeit der Endemie beweist.

2. In diesem Gebiet ist die Malariaübertragung während des Monats Januar infolge des Absinkens der Temperatur in manchen Jahren unter 16°C und während der Regenzeit (Juli—August) vorübergehend unterbrochen.

3. Hinsichtlich der klinischen Äusserungsformen der Malaria, wiegen die Fälle mit geringem Fieber und seltenen Parasiten im Blut vor, was auf das Vorliegen einer alten Malariaendemie in diesem Gebiet hinweist.

Eine Reihe von Fieberfällen mit Milzvergrösserung, bei welchen der Blutbefund negativ war, erheben das Problem anderer, nicht-malarischer Infektionen.

4. Die scharfe Abnahme der Anzahl von Malariafällen nach Durchführung der Zerstäubungen erweist die Wirksamkeit der Desanophelisierungen. In Abhängigkeit von der Beständigkeitsdauer und von der Jahreszeit der Übertragung, müssen die Desanophelisierungen zweimal im Jahre durchgeführt werden.

5. Im untersuchten Gebiet stellt die Art *A. minimus* den Hauptüberträger der Malaria, dar. Als sekundärer Uberträger tritt *A. vagus* auf. Angesichts der kurzen Dauer der Untersuchungen, muss die Bedeutung der Arten *A. jeyporiensis*, *A. aconitus* und insbesonders *A. maculatus* für die Malariaübertragung noch eingehender erforscht werden.

6. Zur Aufrechterhaltung der erzielten Ergebnisse sind besondere Massnahmen für die Gruppen der Eingeborenenbevölkerung, welche die der Zerstäubung unterzogene Zone verlassen erforderlich.

THE NATURE OF MALARIAL ENDEMIA. I. THE EFFICIENCY OF ERADICATION METHODS APPLIED IN AN ENDEMIC AREA IN THE TROPICS

SUMMARY

From investigations concerning malarial endemia and the efficiency of control methods applied in an endemic area in the tropics, the following conclusions may be drawn:

1. According to its orohydrographic characters and to the results of malariometric investigations, the respective area forms an intermediate zone between tha malariological zones II and IV. Thus, the southern part of the territory is characterized by a low degree

of endemia with splenic indices not exceeding 25 per cent, while in the northern part the splenic indices exceed 50 per cent, thus revealing the high degree of endemicity.

2. In this area the transmission of malaria is transiently interrupted during the month of January because of temperature decreases below 16°C in some years, as well as during the rain season (July—August).

3. As regards the clinical manifestations of malaria, cases with low fever and few parasites in the blood prevail, revealing the existence of an old-standing malarial endemia in this area.

A number of subjects displaying fever and increased spleens were negative upon periodic haematological examination and raise the problem of nonmalarial infections.

4. The sudden decrease of malaria cases following spraying shows the efficiency of disanophelization. According to the duration of remanance and to the season of transmission disanophelizations should be carried out twice yearly.

5. In the investigated area, the main vector of malaria is the species *A. minimus ;* the species *A. vagus* appears as a secondary vector. On account of the short period of the investigation, the part played in transmission by the species *A. jeyporiensis*, *A. aconitus* and especially *A. maculatus* should be further investigated.

6. In order to maintain the results achieved, special steps should be taken as regards the autochthonous population groups which leave the sprayed area.

LE CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES CHEZ LE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ATTÉNUÉ (BCG) ET CHEZ SES VARIANTES RÉSISTANTES À LA STREPTOMYCINE, AU PAS ET À L'HYDRASIDE DE L'ACIDE ISONICOTINIQUE.

par

EUGENIA SORU, MARIA ISTRATI, JUDITH SZABADOS D. TĂNĂSESCO et MARIA PARASCHIVESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Services de Biochimie Générale et du vaccin BCG)

— Manuscrit reçu le 23 avril 1961 —

Dans le cadre d'une étude plus ample sur les modifications métaboliques induites par la streptomycine, le PAS et l'hydraside de l'acide isonicotinique, ainsi que par la résistance acquise envers ces antibiotiques chez le *Mycobacterium tuberculosis* BCG (1, 2, 3, 4, 5), le présent travail expose les recherches comparatives du cycle des acides tricarboxyliques chez une souche BCG sensible aux antibiotiques et ses variantes, rendues résistantes par l'addition au milieu de culture de quantités progressives de l'antibiotique respectif. Des recherches antérieures (6) ont indiqué la présence du cycle des acides tricarboxyliques chez *Mycobacterium tuberculosis*; une autre série de travaux concernent l'influence exercée par l'hydraside de l'acide isonicotinique (INH) sur ce même cycle (7).

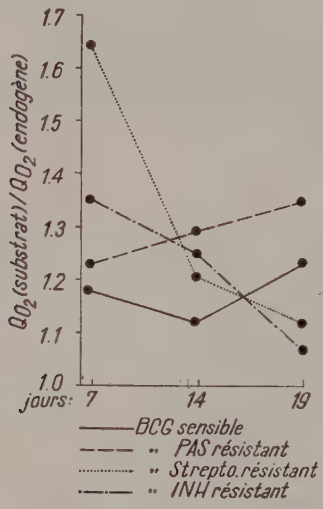
Le problème du mécanisme à action spécifique propre à chaque antibiotique, impose une étude comparative de l'influence de ces antibiotiques sur les différentes voies métaboliques, parmi lesquelles l'une des plus importantes est, sans doute, celle du cycle des acides tricarboxyliques. Cette étude a été effectuée par nous, à l'aide des méthodes suivantes:

1. Détermination de la consommation d'oxygène en présence des composants du cycle des acides tricarboxyliques comme substratum.
2. Détermination directe des cétoacides et des acides di-et tricarboxyliques, participants de ce cycle.
3. Contrôle de la présence des enzymes qui catalysent les différentes étapes du cycle.

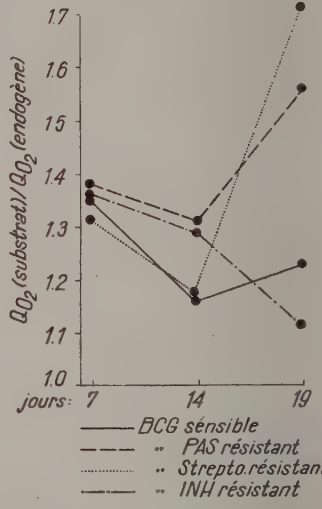
MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches étudiées sont: « *Mycobacterium tuberculosis* BCG », sensible à la streptomycine, PAS et INH (souche utilisée par la Section BCG de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » pour la préparation du vaccin BCG), la souche BCG

streptomycino-résistante (1000 µg/ml), la souche BCG-PAS résistante (500 µg/ml) et la souche BCG-INH résistante (250 µg/ml). Les souches résistantes ont été obtenues à partir de la souche sensible BCG, par addition au milieu (Sauton) de quantités croissantes de l'antibiotique respectif. Les souches devenues résistantes sont conservées sur milieu Sauton additionné d'antibiotique. Les germes utilisés dans nos expériences, ont été obtenus par le passage des cultures susmentionnées sur milieu sans antibiotiques. Nous avons utilisé les germes des cultures de 7, 14 et 19 jours, le processus métabolique variant dans de larges limites avec la phase du cycle de croissance. Les expériences sont exécutées sur des germes débarrassés du milieu de culture par lavages répétés à l'eau bidistillée (« resting bacteria »).



Graphique 1. — Substratum: acide pyruvique.

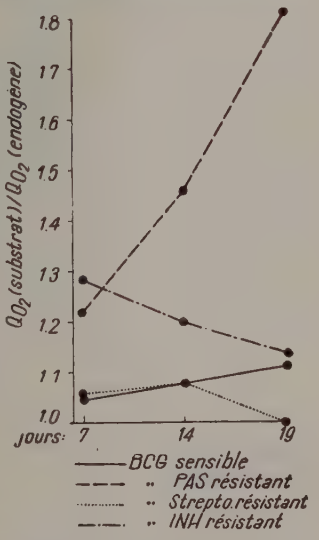


Graphique 2. — Substratum: acide oxalacétique.

La consommation de l'oxygène est déterminée à l'aide de l'appareil Warburg (37°C). On introduit 1 ml suspension de germes en tampon phosphate (pH 7,3 M/15), contenant 20 mg/ml (exprimés en résidu sec) dans les coupes Warburg, en ajoutant comme substratum les divers composants du cycle des acides tricarboxyliques. Simultanément sont introduits des systèmes témoins sans substratum, afin de déterminer la respiration endogène. On établit la consommation d'oxygène à 10 minutes d'intervalle, pendant 60 minutes. Les résultats sont exprimés par le rapport $Q\,0_2$ (substratum) /$Q\,0_2$ (endogène), ou $Q\,0_2 = \mu l\ 0_2$ minutes/g germes. Les valeurs dépassant l'unité indiquent la capacité d'oxyder le substratum respectif, alors que les valeurs sous-unitaires montrent la capacité de ce substratum d'inhiber la respiration endogène des cellules microbiennes. La détermination de la consommation d'oxygène a également été effectuée sur les systèmes acellulaires correspondant aux cultures de

10 jours. Les systèmes acellulaires ont été obtenus sous l'action du désoxycholate de sodium. Les germes sont suspendus en solution de désoxycholate de sodium (0,5%), saccharose (0,25% M) et homogénéisés dans un homogénisateur en verre (type Potter). L'homogénat est soumis à une centrifugation fractionnée, à 800 t/m et 12.000 t/m. Le surnageant de la centrifugation à 800 t/m est soumis à une nouvelle centrifugation à 12.000 t/m. On utilise la fraction déposée à 12.000 t/m, dont le contrôle microscopique indique une désintégration totale des cellules.

Les céto-acides participants du cycle tricarboxylique — l'acide alpha-glutarique et oxalacétique — sont déterminés dans les systèmes après incubation de 60 minutes à 37°, suivie par la déprotéinisation à l'aide de l'acide tungstique. Les céto-acides sont transformés en céto-acide-phénil hydrasone (8) avec 2,4 dinitrophénilhydrasine en solution 2N ClH. Les céto-acidenitrophénilhydrasones de couleur jaune sont soumis à des extractions successives à l'acétate d'éthyl. Le résidu des extraits évaporés, repris en chloroforme ammoniacal séparé par électrophorèse (9) sur papier (Whatman No. 1), en tampon Na-véronal-véronal (pH 8,6; $\mu = 0,1$) $v = 320$. Après 40 minutes, on obtient une séparation efficace des céto-acidediphénilhydrasones oxalacétiques, alpha-cétoglutariques et pyruviques. Les bandes colorées sont éluées en solution CO_3Na_2 10%. L'éluat est soumis au dosage photométrique (filtre 600 mμ). Les solutions témoins des céto-acides authentiques sont soumises aux mêmes manipulations.

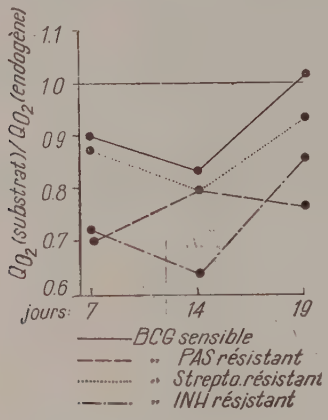


Graphique 3. — Substratum: acide succinique

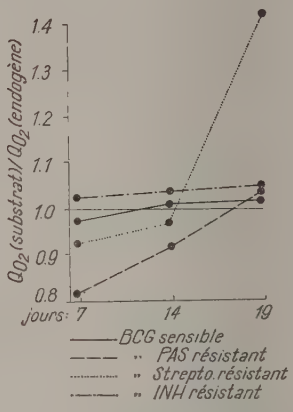
Les acides di- et tricarboxyliques, participants du cycle tricarboxylique sont déterminés dans les systèmes incubés avec les substratums respectifs, après arrêt de la réaction par addition de N/1 SO_4H_2. Dans le surnageant de centrifugation on sépare ces acides par chromatographie sur colonne (8 ×150 mm.) de résine, changeur d'ions Amberlit IRA 400 (cycle formiate) (10). Les éluats contenus dans 50 ml acide formique 6 N (vitesse d'écoulement 1 ml/h.) sont évaporés à sec (bain-marie), le résidu étant soumis à la chromatographie sur papier filtre Whatman No.1 (11) dans le système butanol: acide acétique: eau (4:1:5), et simultanément avec des acides carboxyliques authentiques. Après 18 heures de développement, les feuilles de papier sont séchées à la température du laboratoire et ensuite 1 heure à 70°C.

Pour l'identification des acides, le papier est pulvérisé à l'aide d'une solution contenant: 2 g glucose dans 20 ml H_2O; 2 ml aniline (fraîchement distillée); 60 ml n-butanol; 20 ml éthanol. Après séchage de 10 minutes à 70°, apparition de taches brunes; les fragments colorés sont découpés et élués à chaud, dans de l'acide acétique glacial (10 minutes à 100°C.) Les éluats sont soumis au dosage photométrique (filtre 460 mμ).

Les enzymes du cycle tricarboxylique sont contrôlés sur les cellules intactes et comparativement sur les systèmes acellulaires.



Graphique 4. — Substratum : acide citrique.



Graphique 5. — Substratum : acide isocitrique.

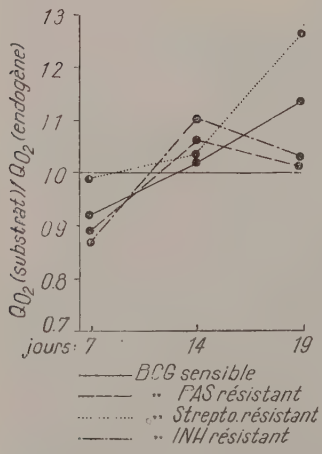
L'enzyme de condensation est contrôlé par la formation de l'acide citrique (12), en présence de l'acide oxalacétique comme substratum. Les expériences sont effectuées d'aprés Ochoa (13). Le système d'incubation contient en plus l'acétylphosphate, le coenzyme A et une transacétilase isolée de E. coli.

L'aconitase est contrôlée par la formation de l'acide citrique utilisant l'acide cis-aconitique comme substratum (14).

L'isocitricdéhydrogénase est mise en évidence par réduction du DPN, en présence de l'acide isocitrique comme substratum et détermination de la densité optique (15).

L'alpha-cétoglutaratdéhydrogénase est contrôlée par réduction du DPN, en présence de l'acide alpha-cétoglutarique comme substratum, du coenzyme A et de l'L-cystéine et détermination de la densité optique (16).

La succindéhydrogénase se détermine par réduction du chlorure de triphényltetrazolium avec production du formazan, en présence de l'acide succinique comme substratum. Les systèmes sont maintenus dans des conditions d'anaérobiose partielle (Thunberg).



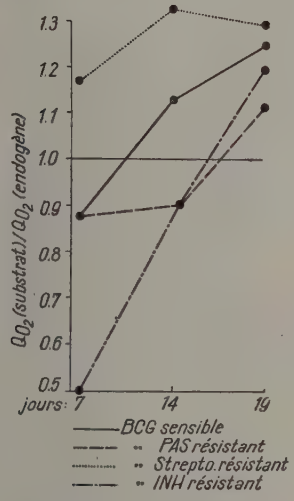
Graphique 6. — Substratum : acide α-cétoglutarique.

La fumarase est déterminée par l'augmentation de la densité optique à 240 mμ, en présence de l'acide malique comme substratum (17).

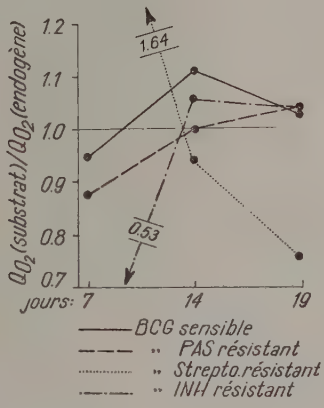
La maliquedéhydrogénase est contrôlée par réduction du DPN à DPNH, en présence de l'acide malique (18).

RÉSULTATS

Oxydation des composants du cycle des acides tricarboxyliques. Les acides pyruvique, oxalacétique et succinique, sont oxydés par les cellules intactes de toutes les variantes, dans toutes leurs phases de croissance(germes provenant de cultures de 7, 14 et 19 jours). Les graphiques 1, 2, 3,



Graphique 7. — Substratum: acide fumarique.



Graphique 8. — Substratum: acide malique.

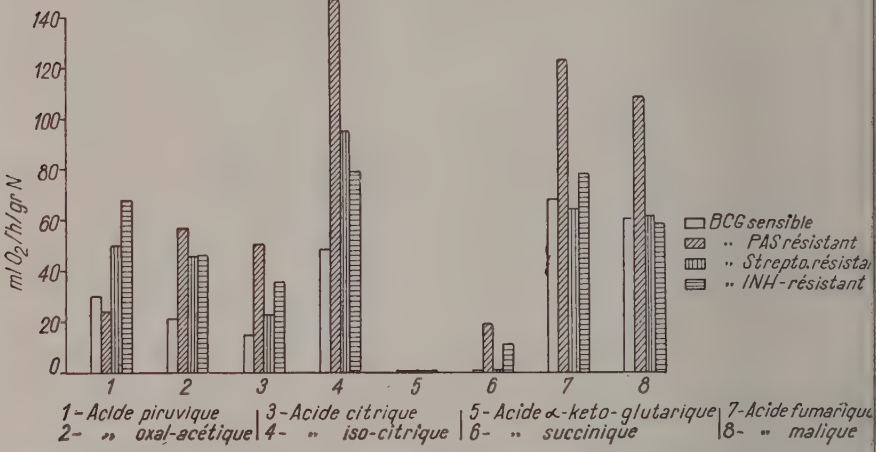
résument les valeurs de l'intensité d'oxydation exprimée par le rapport Q_{O_2} (µl o_2/g germes/minute), en présence et absence du substratum respectif. Le pouvoir d'oxydation varie selon le substratum et la variante microbienne et pour chaque variante avec ses phases de croissance.

L'acide pyruvique (graphique 1) est intensivement oxydé par les cultures jeunes de la variante streptomycino-résistante, beaucoup plus faiblement par les cultures jeunes des autres variantes, et surtout de la forme sensible d'origine. La capacité de la variante streptomycino-résistante d'oxyder l'acide pyruvique est toutefois fortement dimunée chez les germes se trouvant à la fin de leur phase exponentielle (cultures de 14 jours) et phase stationnaire (19 jours). On constate pareillement une diminution de la capacité d'oxydation en fonction de l'âge des cultures chez la variante INH-résistante, mais non chez la variante PAS résistante et la forme sensible, qui conservent, dans une certaine mesure, le pouvoir d'oxyder l'acide pyruvique, pendant toutes leurs phases de croissance.

L'acide oxalacétique (graph. 2) est oxydé par les cellules jeunes de toutes les variantes avec la même intensité; il est plus intensément oxydé par la variante

PAS-résistante et INH-résistante, se trouvant à la fin de la phase exponentielle intensivement par la variante streptomycino-résistante et PAS-résistante et très faiblement, dans cette même phase, par la variante INH-résistante et la forme sensible d'origine.

L'acide succinique (graph. 3) est beaucoup plus intensément oxydé par la variante PAS-résistante que par les autres variantes, se trouvant à la fin de leur phase exponentielle et stationnaire. La capacité d'oxydation de la variante INH



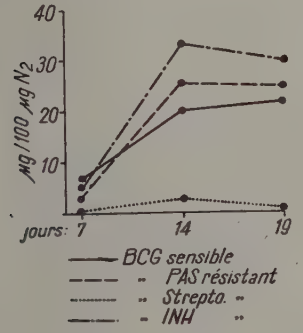
Graphique 9. — Oxydation des composants du cycle des acides tricarboxyliques de systèmes acellulaires du *Mycobacterium tuberculosis* BCG et ses variantes PAS-, streptomycino- et INH résistentes.

résistante et surtout celle de la forme sensible de départ et de la variante streptomycino-résistante est beaucoup plus faible que celle des cellules en phase stationnaire, qui n'oxydent point le succinate. La résistance envers le PAS est donc accompagnée d'une augmentation de la capacité d'oxyder le pyruvate, l'oxalacétate et le succinate. Les systèmes acellulaires correspondants, obtenus par les techniques décrites, oxydent beaucoup plus faiblement ces mêmes substratums et surtout l'acide succinique.

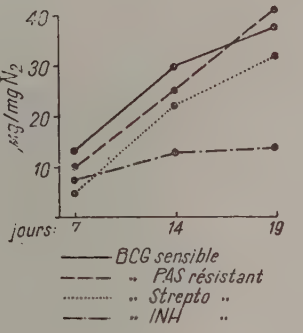
L'acide citrique n'est oxydé par les cellules intactes d'aucune variante; ce composant, au contraire, inhibe nettement la respiration endogène, l'action inhibante la plus intense s'exerçant sur la variante INH-résistante . Les cellules désintégrées ont la capacité d'oxyder l'acide citrique (graph. 9) indiquant ainsi comme dans le cas d'autres cellules microbiennes (19) l'incapacité de ce substratum de traverser la membrane cellulaire, condition nécessaire pour réaliser le contact avec l'enzyme spécifique.

L'acide isocitrique est oxydé seulement par les cellules de la variante streptomycino-résistante, en phase stationnaire et très faiblement par la variante INH-résistante. Il inhibe l'oxydation endogène de la variante PAS-résistante et de la forme sensible (graph. 5). L'acide isocitrique est intensivement oxyd

par les systèmes acellulaires (graph. 9.). Sous cette forme, les variantes résistantes et surtout la variante PAS-résistante oxydent plus intensément l'acide isocitrique que la forme sensible de départ et le plus intensivement la variante PAS-résistante (fig. 9.).

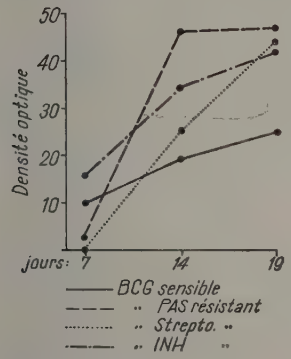


Graphique 10. — L'enzyme de condensation.

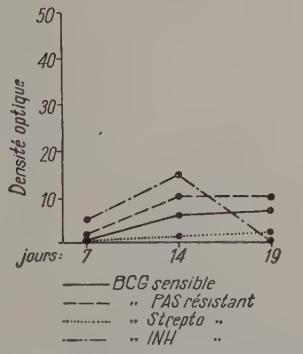


Graphique 11. — Aconitase.

L'acide alpha-cétoglutarique n'est pas oxydé par les cellules intactes des cultures jeunes, sur lesquelles il exerce même un effet inhibiteur de la respiration endogène (graph. 6). Il est faiblement oxydé par les cellules se trouvant à



Graphique 12. — Isocitrique-déhydrogénase.

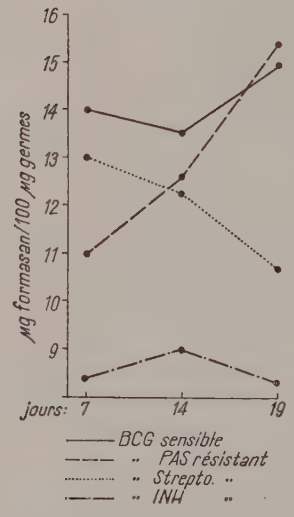


Graphique 13. — α-cétoglutaratedéhydrogénase.

la fin de la phase exponentielle, mais nettement oxydé par la forme BCG-sensible et surtout par la variante streptomycino-résistante en phase stationnaire. Il n'est point oxydé par les cellules désintégrées (graph. 9). TUCKER constate chez le *Corynebacterium erythrogenes* (20) que la destruction par ultra-sons des cellules bactériennes conduit à la perte de la capacité d'oxyder l'alpha-cétoglutarate et à une diminution du pouvoir d'oxyder le succinate, fait constaté

également chez les souches étudiées et soumises, à l'aide du désoxycholate, à une désagrégation cellulaire.

L'acide fumarique est intensément oxydé par la variante streptomycino-résistante, dans toutes ses phases de croissance et plus faiblement par la forme sensible se trouvant à la fin de la phase exponentielle ou en phase stationnaire; il est oxydé par les variantes INH et PAS-résistantes (graph. 7), seulement dans la phase stationnaire. L'acide fumarique est cependant intensivement oxydé par les cellules de toutes les variantes et surtout par celles de la variante PAS-résistante, après leur désintégration à l'aide du désoxycholate (graph. 9).



Graphique 14. — Succinedéhydrogenase.

L'acide malique est très intensivement oxydé par les cellules intactes de la variante streptomycino-résistante (au début de sa phase exponentielle), mais inhibe l'oxydation endogène des cellules à la fin de leur phase exponentielle et en phase stationnaire. Le malate est oxydé par la forme sensible, surtout à la fin de sa phase exponentielle. Ce composant est intensément oxydé par les cellules désintégrées, (graph. 9) surtout par celles de la variante PAS-résistante. Il est à remarquer que les divers substratums sont le plus intensivement oxydés par la variante PAS-résistante et que les systèmes acellulaires de cette variante ont une capacité d'oxydation beaucoup plus élevée que les cellules intactes correspondantes. La résistance au PAS semble être accompagnée d'une augmentation de la capacité d'oxydation du cycle des acides tricarboxyliques. La détermination directe des céto-acides et acides carboxyliques (di- et tetracarboxyliques) fournit des données superposables à celles obtenues par la détermination de l'activité des enzymes qui catalysent la synthèse de ces substratums.

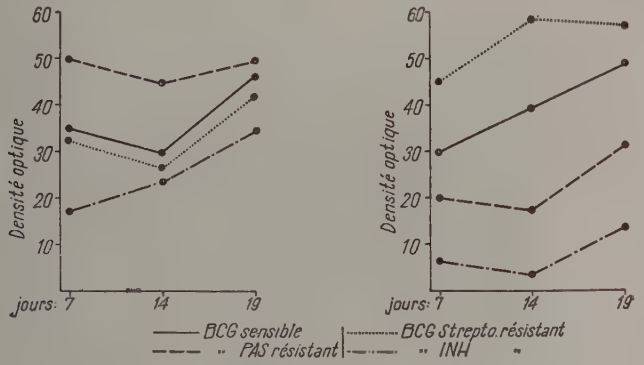
Les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques. L'enzyme de condensation a une activité extrêmement réduite chez la variante streptomycino-résistante ce qui indiquerait, à ce niveau du cycle, un effet analogue à celui signalé pour la streptomycine chez d'autres microorganismes (21,23) (graph. 10). La variante PAS-résistante, INH-résistante et la forme sensible de départ ont une activité évidente à la fin de leur phase exponentielle de croissance, plus faible dans la phase stationnaire et très faible au début de la phase exponentielle.

L'aconitase a une faible activité au début de la phase exponentielle de croissance pour toutes les variantes, mais une activité nette à la fin de la phase exponentielle et surtout dans la phase stationnaire. Ce sont les variantes PAS-résistante et la variante sensible qui présentent l'activité la plus nette (graph. 11).

L'isocitricdéhydrogénase est moins active chez la souche sensible que chez les variantes résistantes aux antibiotiques, à l'exception de la variante streptomycino-résistante, dont l'activité est extrêmement réduite au début de la phase

exponentielle de croissance (fig. 12). La variante PAS-résistante possède l'activité la plus intense.

L'alpha-cétoglutaratdéhydrogénase présente une activité très faible chez toutes les variantes. (fig. 13).

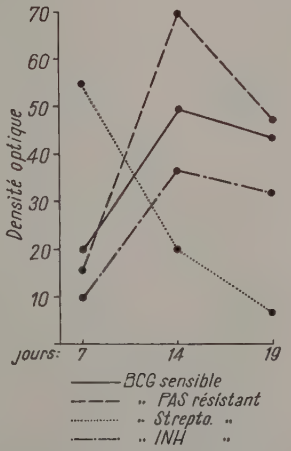


Graphique 15. — Fumarase. — à gauche — système acellulaire; à droite — cellule intacte.

L'acide succindéhydrogénase est très actif chez la souche sensible et la variante PAS-résistante, et faiblement actif chez la variante INH-résistante (fig. 14).

La fumarase manifeste l'action la plus faible chez la variante INH-résistante et la plus intense chez la variante streptomycino-résistante. Dans les systèmes acellulaires, c'est la variante PAS-résistante qui possède l'activité fumarasique la plus intense, la variante INH-résistante conservant, dans ces mêmes conditions, une très faible activité de cet enzyme (graph. 15 a et 15 b).

La maliquedéhydrogénase de la variante streptomycino-résistante possède, à la fin de la phase exponentielle de croissance de cette souche, une activité optimum. Les variantes INH- et PAS-résistantes ont une activité plus faible que la souche sensible. En ce qui concerne les systèmes acellulaires, c'est la variante PAS-résistante qui possède l'activité la plus intense (graph. 16 et 9).



Graphique 16. — Maliquedéhydrogénase.

CONCLUSIONS

Le cycle des acides tricarboxyliques, l'une des voies majeures de l'oxydation terminale des métabolites, a été étudié chez « *Mycobacterium tuberculosis* BCG» et comparativement chez ses variantes rendues résistantes aux antibiotiques par l'addition de quantités progressives au milieu de culture (Sauton): streptomycine (1000 µg/ml), PAS (500 µg/ml), et INH

(250 µg/ml). Ce cycle d'oxydation a été étudié par les voies de contrôle suivantes:

1. Mise en évidence des enzymes spécifiques à chaque étape du cycle.

2. Détermination de la consommation d'oxygène en présence des composants du cycle comme substratum (appareil Warburg). Les déterminations ont été effectuées avec des cellules intactes, ainsi qu'à l'aide des systèmes acellulaires.

3. Détermination des céto-acides et des acides di- et tricarboxyliques participants du cycle. Les céto-acides transformés en céto-acidedinitrophénilhydrasone sont séparés par électrophorèse sur papier et dosés par photométrie. Les acides di- et tricarboxyliques sont séparés sur colonne Amberlit IRA- 400, identifiés par chromatographie sur papier et dosés par photométrie.

Les résultats obtenus par les différentes méthodes de contrôle, montrent que l'installation de la résistance envers les antibiotiques est accompagnée d'une modification évidente de la métabolisation par la voie du cycle de l'acide tricarboxylique. Les modifications sont fonction de chaque étape du cycle, de l'antibiotique qui a induit la résistance, de même que de la phase de croissance de la variante respective.

Les acides pyruvique, oxalacétique et succinique sont oxydés par les cellules intactes et les systèmes acellulaires de toutes les variantes et dans toutes les phases de croissance. L'intensité d'oxydation est variable pour les diverses variantes. L'acide citrique n'est pas oxydé par les cellules intactes, ce composant constituant même un inhibiteur de leur respiration endogène. L'acide citrique est cependant oxydé par les systèmes acellulaires correspondants et le plus intensivement par la variante PAS-résistante. L'acide iso-citrique n'est pas oxydé par les cellules intactes, à l'exception de la variante streptomycino-résistante en phase stationnaire, mais il est oxydé par les systèmes acellulaires de toutes les variantes. L'acide alpha-cétoglutarique est oxydé par les cellules intactes de la souche sensible d'origine; il n'est oxydé par les systèmes acellulaires d'aucune variante. L'acide fumarique est oxydé par la variante streptomycino-résistante, dans toutes ses phases de croissance et par les autres variantes seulement en phase stationnaire. L'acide malique est fortement oxydé par la variante streptomycino-résistante se trouvant à la fin de la phase de croissance exponentielle et beaucoup plus faiblement par les autres variantes. Les composants du cycle des acides tricarboxyliques sont oxydés par les systèmes acellulaires de la variante PAS-résistante plus intensément que par toutes les autres variantes. La variante streptomycino-résistante présente une inhibition marquée dans l'étape catalysée par l'enzyme de condensation, la variante INH-résistante, une inhibition nette dans l'étape catalysée par la succindéhydrogénase, la variante PAS et INH-résistante, une inhibition de l'étape catalysée par la fumarase.

Les données expérimentales obtenues dans l'étude du cycle des acides tricarboxyliques indiquent, en plus d'une localisation plus évidente dans certaines phases d'action de chaque antibiotique, un dérèglement inter-corrélé et complexe de toutes les étapes de ce cycle.

BIBLIOGRAPHIE

1. Soru E., Istrati M. et Paraschivesco M. — Naturwiss., 1958, **45**, 578.
2. Soru E., Istrati M. et Paraschivesco M. — Naturwiss, 1960, **47**, 237.

3. Soru E., Istrati M., Sculptoreanu J. et Paraschivesco M. — Arch. Roum. Path. exp. et de Microbiologie, 1960, **19**, 189.
4. Soru E., Tănăsesco D. et Paraschivesco M. — Cercetări de Biochimie, Acad. R.P.R. (sous presse).
5. Soru E., Tănăsesco D. et Paraschivesco M. — Revue de Chimie Acad. R. P. R. (sous presse).
6. Millman J., et Youmans G. P. — J. Bact., 1955, **69**, 320.
7. Nasta M. et Păunesco E. — Studii şi Cercet. de Inframicrobiol., Microbiol. şi Parazitol., 1958, **9**, 471.
8. Neish W. J. P. — dans « Methods of Biochemical Analysis » ed. by David. Glick, Interscience Publ., New York, 1957, **5**, 109.
9. Tauber H. — Analyt. Chem., 1955, **27**, 287.
10. Nordmann R. et coll. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, **36**,1461.
11. Charles J. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, **40**, 221.
12. Natelson S., Pincus J. B., et Lugovoy J. K. — J. Biol. Chem., 1948, **175**, 745.
13. Ochoa S. — dans: « Methods in Enzymology », ed. by Sidney P. Colowick a. Nathan O. Kaplan. Academic Press Inc. Publ., New-York, 1955, **1**, 685.
14. Anfinsen C. B. — dans: « Methods in Enzymology », ed. by Sidney P. Colowick a. Nathan O. Kaplan. Academic Press Inc. Publ., New-York, 1955, **1**, 695.
15. Ochoa S. — dans: « The Enzymes », ed. by Sumner a. K. Myrbäck, Academic Press Inc. Publ., New York, 1951, **2**, part. 2, 929.
16. Kaufman S. — dans: « Methods in Enzymology », ed. by Sydney P. Colowick, a. Nathan O. Kaplan, Academic Press Inc. Publ., New-York, 1955, **1**, 714.
17. Bonner W. D. — ibid., 1955, **1**, 722.
18. Ochoa S. — ibid. 1955, **1**, 735.
19. Saz H. J. et Krampitz L. O. — J. Bact., 1954, **67**, 409.
20. Tucker R. G. — J. Gen. Microbiol., 1960, **23**, 267.
21. Umbreit W. W. et coll. — J. Bact., 1949, **58**, 747.
22. Gauze G. F. — O mehanisme deistviia antibiotikov: « Lektii po antibiotikam, Medghiz, 1959.

ЦИКЛ ТРИКАРБОКСИЛОВЫХ КИСЛОТ У СМЯГЧЕННОГО «МИКОБАКТЕРИУМ ТУБЕРКУЛОЗИС» (БЦЖ) И У ЕГО ВАРИАНТОВ РЕЗИСТЕНТНЫХ К СТРЕПТОМИЦИНУ, ПАСК И ГИДРАЗИДУ ИЗОНИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Цикл трикарбоксиловых кислот, представляющий собою один из главных путей окончательного окисления, был исследован автором настоящей статьи у смягченного «Микобактериум туберкулозис» (БЦЖ) и — сравнительно у полученных из этого возбудителя резистентных вариантов путем добавления к его питательной среде (среда Саутона) повышающихся концентраций соответствующего антибиотика: стрептомицина (1000 γ/мл.) ПАСК (500 γ/мл) и гидразида изоникотиновой кислоты (250 γ/мл). Исследование этого цикла окисления изучалось с использованием следующих контрольных методов:

1. Выявление наличия энзим, являющихся специфическими для каждого из этапов цикла.

2. Определение потребления кислорода при наличии компонентов цикла в качестве субстрата (с использованием аппарата Варбурга); потребление кислорода изучалось как в интактных клетках, так и в безклеточных системах.

3. Определение кетокислот, а также и ди-и трикарбоксиловых кислот компонентов цикла. Кетокислоты, превращающиеся в кетодинитрофенилгидразон кислоты отделились при помощи электрофореза на бумаге и количественно измерялись при помощи фотометрического метода. Ди- и трикарбоксиловые кислоты отделились на колонке амбарлитта IRA- 400, идентифицировались при помощи хроматографического метода на бумаге и количественно определялись при помощи фотометрического метода.

Полученные при помощи этих контрольных методов результаты показали, что появление резистентности в отношении вышеупомянутых антибиотиков сопровождаются видимыми изменениями обмена, капающегося использования цикла трикарбоксиловых кислот. Эти изменения зависят от каждого этапа цикла, от антибиотика, в отношении которого индуцировалась резистентность, а также и от стадии роста каждого варианта.

Пировиноградная, щавелево-кетоиновая и янтарная кислоты окисляются интактными клетками и бесклеточными системами всех вариантов во время всех стадий роста. Интенсивность окисления является различной для каждого из вариантов. Лимонная кислота не окисляется интактными клетками, для которых она является даже тормозителем их эндогенного дыхания. Эта кислота, однако, окисляется соответствующими бесклеточными системами. Наиболее сильно окисляется лимонная кислота ПАСК-резистентным вариантом. Изолимонная кислота также не окисляется интактными клетками, за исключением стрептомицино-резистентного варианта, находящегося в стабильной стадии. Эта кислота однако окисляется бесклеточными системами. Альфа-кето-глютаровая кислота окисляется интактными клетками, первоначально чувствительного варианта; она не окисляется бесклеточными системами ни одного из вариантов. Фумаровая кислота окисляется стрептомицино-резистентным вариантом во всех стадиях роста, а остальными вариантами — только в их стабильной стадии. Яблочная кислота интенсивно окисляется стрептомицино-резистентным вариантом в конечной стадии его экспоненциального роста и более слабо — другими вариантами. Бесклеточные системы ПАСК-резистентного варианта окисляют компоненты цикла трикарбоксиловых кислот более интенсивно, чем все остальные варианты. В отношении стрептомицино-резистентных вариантов отмечается выраженное торможение этапа, который катализируется конденсационной энзимой. В отношении резистентного к гидразиду изоникотиновой кислоты варианта, отмечается выраженное торможение этапа катализированного янтарной дегидрогеназой а в отношении резистентного к ПАСК и гидразиду изоникотиновой кислоты варианта отмечается торможение этапа, который катализируется фумаразой.

Полученные автором при изучении цикла трикарбоксиловых кислот экспериментальные данные, наряду с более ясной локализацией действия каждого антибиотика в определенном этапе цикла, указывают также и на комплексное нарушение равновесия различных отношений между всеми этапами этого цикла.

DER TRIKARBOXYLSÄURENZYKLUS BEIM ABGESCHWÄCHTEN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (BCG) UND DEN ENTSPRECHENDEN GEGEN STREPTOMYZIN, PAS UND ISONIKOTINSÄUREHYDRAZID WIDERDSTANDSFÄHIGEN VARIANTEN

ZUSAMMENFASSUNG

Der Trikarboxylsäurenzyklus, einer der Hauptwege der Endoxydation, wurde beim abgeschwächten *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) und vergleichend bei Varianten untersucht, die durch Zusatz von Antibiotika in steigenden Konzentrationen zum Nährboden (Sauton's Nährlösung) gegen das betreffende Antibiotikum widerstandsfähig gemacht worden waren (Streptomyzin 1000 μg/ml, PAS 500 μg/ml und HIN 250 μg/ml). Das Studium dieses Oxydationszyklus wurde auf folgenden Wegen durchgeführt:

1. Nachweis der für jeden Zyklusabschnitt spezifischen Enzyme.

2. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in Anwesenheit der Zyklusbestandteile als Substrat (Warburgs Apparat). Der Sauerstoffverbrauch wurde sowohl an unbeschädigten Zellen als auch an zellfreien Systemen bestimmt.

3. Bestimmung der den Zyklus bildenden Ketosäuren und Di- und Trikarboxylsäuren. Die Ketosäuren wurden in Ketosäuredinitrophenylhydrazone überführt, durch Papierelektrophorese abgetrennt und photometrisch ausgewertet. Die Di- und Trikarboxylsäuren wurden mit Hilfe einer IRA-400 Amberlitkolonne abgetrennt, durch Papierchromatographie identifiziert und photometrisch ausgewertet.

Die auf diesen Wegen erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass die Erwerbung der Widerstandsfähigkeit gegen die erwähnten Antibiotika von einer offenbaren Veränderung des Stoffwechsels über den Trikarboxylsäurenzyklus begleitet ist. Die Veränderungen finden in Abhängigkeit von den einzelnen Zyklusabschnitten, vom Antibiotikum, gegen das die Widerstandsfähigkeit erworben wurden sowie von der Wachstumsphase der betreffenden Variante statt.

Brenztraubensäure, Oxalessigsäure und Bernsteinsäure werden von den unbeschädigten Zellen und von den zellfreien Systemen aller Varianten in allen Wachstumsphasen oxydiert. Die Intensität der Oxydation ist bei den verschiedenen Varianten verschieden. Zitronensäure wird von unbeschädigten Zellen nicht oxydiert und stellt sogar einen Hemmungsfaktor ihrer endogenen Atmung dar. Dagegen wird Zitronensäure von den entsprechenden zellfreien Systemen oxydiert und zwar am stärksten von der PAS-resistenten Variante. Isozitronensäure wird von unbeschädigten Zellen ebenfalls nicht oxydiert, mit Ausnahme der streptomyzinresistenten Variante in ihrer stationären Phase; von zellfreien Systemen wird sie oxydiert. Alpha-Ketoglutarsäure wird von den unbeschädigten Zellen der empfindlichen Ausgangsvariante oxydiert, nicht aber von den zellfreien Systemen irgendeiner Variante. Fumarsäure wird von der streptomyzinresistenten Variante in allen ihren Wachstumsphasen oxydiert, von den anderen Varianten nur in ihrer stationären Phase. Apfelsäure wird von der streptomyzinresistenten Variante gegen Ende ihrer exponentiellen Wachstumsphase intensiv und von den anderen Varianten viel schwächer oxydiert. Die zellfreien Systeme der PAS-resistenten Variante oxydieren die Bestandteile des Trikarboxylsäurenzyklus intensiver als alle anderen Varianten. Die streptomyzinresistente Variante weist eine ausgeprägte Hemmung der durch das Kondensationsenzym katalysierten Etappe auf, die INH-resistente Variante eine deutliche Hemmung der durch Sukzinodehydrase katalysierten Etappe, die PAS- und IHN-resistenten Varianten eine Hemmung der durch Fumarase katalysierten Etappe.

Die beim Studium des Trikarboxylsäurezyklus' erhaltenen Versuchsergebnisse weisen, ausser auf eine ausgeprägtere Lokalisierung der Einwirkung eines jeden Antibiotikums in bestimmten Etappen, auf eine zusammenhängende und komplexe Regulationsstörung aller Abschnitte dieses Zyklus hin.

THE TRICARBOXYLIC ACID CYCLE IN ATTENUATED *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* (BCG) AND IN THE CORRESPONDING STREPTOMYCIN, PAS AND INH- RESISTANT VARIANTS

SUMMARY

The tricarboxylic acid cycle, which is one of the major pathways of terminal oxidation, has been comparatively investigated in attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) and in its variants in which resistance had been induced by adding increasing amounts of the respective antibiotic (streptomycin 1000 μg./ml. PAS 500 μg./ml., and INH 250 μg./ml.) to the culture medium (Sauton's medium). The study of this oxidation cycle was carried out by the following means:

1. Demonstration of the specific enzymes characterizing each of the stages of the cycles.
2. Determination of oxygen consumption in the presence of each component of the cycle as a substrate (Warburg's apparatus); oxygen consumption was determined both in intact cells and in cell-free systems.
3. Determination of keto-acids and of the di- and tricarboxylic acid components of the cycle. The keto-acids were transformed into keto-aciddinitrophenylhydrazones, separated by paper electrophoresis, and assessed photometrically. The di- and tricarboxylic acids were separated on Amberlit IRA 400 columns, identified by paper chromatography, and assessed photometrically.

The results obtained by these methods showed the acquirement of resistance to the above antibiotics to be accompanied by an obvious change of the metabolism involving the tricarboxylic acid cycle. The changes are related to each of the steps of the cycle, to the antibiotic to which resistance has been induced, as well as to the stage of development of the respective variant.

Pyruvic, oxalacetic, and succinic acids are oxidized by the intact cells and by the cell-free systems of all the variants during all growth stages. The intensity of oxidation differs

in the different variants. Citric acid is not oxidized by intact cells, for which it is even an inhibitor of endogenous respiration. On the other hand, citric acid is oxidized by the corresponding cell-free systems. The highest intensity of oxidation is displayed by the PAS resistant variant. Isocitric acid is likewise not oxidized by intact cells, with the exception of the streptomycin-resistant variant in its stationary phase. It is oxidized by cell-free systems. Alphaketoglutaric acid is oxidized by the intact cells of the original susceptible variant; it is not oxidized by the cell-free systems of any of the variants. Fumaric acid is oxidized by the streptomycin-resistant variant in all its growth stages and by the other variants in their stationary phase only. Malic acid is intensely oxidized by the streptomycin-resistant variant at the end of the exponential growth phase and much less by the other variants. The cell-free systems of the PAS-resistant variant oxidize the components of the tricarboxylic acid cycle more intensely than all the other variants. The step catalyzed by the condensation enzyme is markedly inhibited by the streptomycin-resistant variant, there is a clear-cut inhibition of the step catalyzed by succinic dehydrogenase in the INH-resistant variant, and an inhibition of the step catalyzed by fumarase in the PAS and INH resistant variants.

Apart from a more obvious involvement of certain stages by the action of each antibiotic, the experimental findings made in the study of the tricarboxylic acid cycle reveal an intercorrelated and complex disturbance of all the stages of this cycle.

SUR LES RÉACTIONS SÉROLOGIQUES ET ALLERGIQUES DANS LES FORMES CHRONIQUES ET LATENTES DE BRUCELLOSE

par

MARIA ZALMAN, V. LUŞTREA, DOINA GHERMAN et S. LEVIN

(Travail de l'Institut Médico-Pharmaceutique de Timişoara — Chaire de Microbiologie)

— Manuscrit reçu le 12 février 1961 —

Dans une note antérieure (5) nous avons signalé l'existence des formes latentes et chroniques de brucellose, observées dans les abattoirs A et T. Ce fait nous a déterminé à étendre nos recherches à d'autres abattoirs de la région, ainsi qu'à poursuivre du point de vue dynamique l'évolution des anticorps et de l'allergie, chez les mêmes personnes, à intervalles de 6—18 mois.

Dans le présent travail nous exposons les résultats des recherches effectuées sur 167 ouvriers des abattoirs J., L., R. et S., pendant l'année 1957, ainsi que les résultats obtenus par la réexamination du personnel des abattoirs A., S. et T., à intervalles de 6 et 18 mois.

Tous les sujets etudiés ont été soumis à l'examen sérologique complet.

I. *Incidence des formes latentes et chroniques de brucellose chez les ouvriers des abattoirs* J., L., S. *et* R. On a constaté que l'incidence de la brucellose chez les sujets étudiés varie d'un abattoir à l'autre, en fonction des conditions épidémiologiques locales, étant complètement absente chez les ouvriers de l'abattoir R. et atteignant un maximum (23,7%) parmi ceux de l'abattoir S.

Du total de 24 personnes qui ont eu des réactions positives aux différents tests effectués pour le dépistage de l'infection brucellique, 6 ont eu une réaction séro-allergique, 9 seulement allergique et les autres 9 uniquement sérologique, ainsi qu'il ressort du tableau I.

Tableau I

Résultats des analyses effectuées pour le dépistage de l'infection brucellique.

Abattoir	Total sujets examinés	Réactions positives		
		séro-allergiques	allergiques	sérologiques
J.	9	—	1	—
L.	22	—	3	1
R.	36	—	—	—
S.	80	6	5	8

Des 42 personnes ayant accusé des douleurs rhumatismales, 18 ont eu des réactions positives (tableau II), ce qui nous permet de recommander dans

Tableau II

Relations entre les cas de rhumatisme chronique et les résultats des examens de laboratoire pour la brucellose

No. crt.	Cas	Symptômes cliniques					IDR positive	Réactions sérologiques positives			
		Céphalée	Asthénie	Transpiration	Rhumatisme	Affections des divers organes		Wright	Huddleson	RFC	Test Coombs
					Abattoir S.						
1	T.I.	+	-	—	+	—	—	—	—	—	+
2	P.G.	—	—	—	+	—	+	—	—	—	+
3	T.I.	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
4	S.A.	—	—	-	+	—	+	—	—	—	—
5	C.I.	—	—	—	+	foie	—	+	—	—	—
6	N.I.	-	—	—	+	—	—	—	—	—	—
7	R.I.	—	—	-	+	—	—	-	—	—	—
8	F.R.	+	—	—	+	-	—	—	—	—	—
9	P.Z.	—	—	—	+	-	—	-	—	—	—
10	H.E.	-	—	—	+	-	+	—	-	—	—
11	M.I.	—	—	—	+	-	+	—	—	—	+
12	M.E.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
13	H.O.	+	—	+	+	foie	—	—	—	—	—
14	O.A.	-	—	—	+	—	—	—	—	—	—
15	N.M.	—	-	—	+	—	—	—	—	-	—
16	P.C.	—	-	—	+	—	+	—	—	—	—
17	B.V.	—	-	—	+	—	—	—	—	—	—
18	A.G.	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—
19	M.F.	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
20	K.L.	—	-	+	+	—	—	—	—	—	—
21	M.R.	+	-	—	+	—	—	—	—	—	—
22	D.I.	—	—	+	+	-	—	—	—	—	—
23	S.P.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
24	C.P.	—	-	+	+	+	—	—	-	—	—
25	C.A.	+	—	+	+	-	+	—	—	—	+
26	D.I.	—	—	—	+	—	—	—	-	—	+
27	M.N.	+	—	—	+	—	—	—	-	—	—
28	I.L.	—	—	+	+	—	—	+	—	—	+
29	H.G.	—	—	+	+	+	-	-	—	—	—
30	S.T.	—	—	—	+	—	-	—	—	—	—
31	F.G.	—	-	—	+	-	+	—	—	—	—
32	V.A.	—	-	+	+	—	—	—	—	—	—
33	F.G.	+	—	—	+	-	+	—	—	—	—
34	K.G.	—	—	+	+	—	—	-	—	—	—
35	N.M.	—	—	—	+	—	—	+	+	—	—
36	M.B.	+	-	+	+	—	—	—	—	—	—
37	V.M.	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
38	P.C.	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—
39	S.B.	—	—	—	+	·	-	—	—	—	—
40	M.E.	—	-	—	+	·	+		—	—	+
					Abattoir L.						
41	B.C.	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
42	G.T.	—	—	+	+	—	+	—	—	·	—

la maladie rhumatismale, la recherche de l'étiologie brucellique chez les malades provenant du milieu agricole, du personnel vétérinaire et des ouvriers des industries qui utilisent des matières premières d'origine animale.

Dans les trois abattoirs où on a trouvé des cas positifs, on a également étudié le pourcentage de positivité, en fonction de la profession, du stage professionnel, de l'âge et du sexe. On a constaté des cas positifs chez les deux médecins vétérinaires, les assommeurs, les bouchers, les ouvriers qui lavent les boyaux, les charcutiers, les blanchisseuses, les cuisinières, les garçons d'écurie et, ce qui est intéressant, parmi les mécaniciens (3 cas sur 17).

Tableau III

Incidence de la brucellose par groupes d'âge chez les ouvriers des abattoirs J., L. et S.

Groupes d'âge	Total sujets examinés	Total cas positifs
17—20 ans	17	4
21—30 ans	28	8
31—45 ans	33	2
46—50 ans	22	9
51—60 ans	8	1
61—70 ans	3	—

La répartition par groupes d'âge est consignée dans le tableau III; on constate une incidence maximum entre 40 et 50 ans, suivie par le groupe de 21 à 30 ans.

Tableau IV

Incidence de la brucellose en fonction du stage professionnel chez les ouvriers des abattoirs J., L. et S.

Stage professionnel	Total sujets examinés	Total cas positifs
0— 1 an	14	2
1— 5 ans	52	12
6—10 ans	36	6
11—20 ans	3	1
21—30 ans	6	3

En ce qui concerne le stage professionnel, on observe d'après les données du tableau IV, une incidence maximum chez les personnes ayant un stage entre 1—5 ans (constatation faite dans les 3 abattoirs étudiés) et chez les personnes avec un stage dépassant 15 ans (fait constaté seulement dans l'abattoir S.)

Quant à la positivité des différentes réactions et la corrélation entre elles, nous remarquons, ainsi que dans le cas des abattoirs A. et T., une divergence nette, non seulement entre l'intradermoréaction à la brucelline et les réactions sérologiques, mais aussi entre les réactions sérologiques elles-mêmes (tableaux I et V).

Tableau V

Résultats des réactions sérologiques

Abattoir	Réaction Wright	Réaction Huddleson	R.F.C. positive	Réaction Wright et RFC positives	Test Coombs
L.	—	—	1	—	—
S.	1	—	4	--	9

Observation: Le test Coombs a été effectué seulement dans le cas d'une réaction Wright négative.

En ce qui concerne la discordance entre la réaction allergique positive et les réactions sérologiques négatives, elle s'explique soit par la pathogénie et l'évolution de l'infection brucellique elle-même, soit par l'existence des anticorps univalents (blocants), fréquemment constatés dans la brucellose.

Des deux modes de réaction de l'organisme envers la brucellose, seule la réaction allergique est spécifique, les anticorps pouvant être élaborés aussi par les antigènes brucelliques tués, introduits dans l'organisme par la consommation d'aliments bouillis, ainsi que par d'autres germes qui contiennent des antigènes communs aux brucella.

Néanmoins, en vue du diagnostic, il ne faut pas omettre que l'état allergique peut s'installer tardivement, au cours des formes aiguës, pouvant aussi disparaître dans le cas où sur le fond d'une brucellose latente survient une poussée aiguë, alors que les réactions sérologiques dans ces cas sont positives.

L'existence des anticorps blocants peut expliquer non seulement la discordance entre les réactions sérologiques et les réactions allergiques, mais jusqu'à un certain point, aussi la discordance entre les différentes réactions sérologiques elles-mêmes, vu qu'ils n'influencent pas dans la même mesure les réactions avec ou sans intervention de l'alexine, ou celles qui exigent des concentrations différentes d'antigène et d'anticorps.

Les anticorps univalents peuvent être dépistés par le test Coombs, qui augmente sensiblement le pourcentage des réactions sérologiques positives et, par conséquent, les chances de diagnostic dans toutes les formes de brucellose. Ainsi, Pop (1), sur 90 personnes infectées, constate une réaction positive dans 25,6% des cas par la réaction Wright et dans 84,4% par le test Coombs. Selon nos recherches antérieures (5) sur l'incidence de la brucellose parmi les ouvriers des abattoirs A. et T. nous avons trouvé la réaction Wright positive dans 45 cas; or sur 100 sérums Wright-négatifs, le test Coombs a permis de déceler en plus 21 autres résultats positifs.

Dans le présent travail, le test Coombs a également permis l'augmentation du pourcentage de positivité, parmi les ouvriers de l'abattoir S., de 18,7% à 23,7%. Sur 6 cas ayant présenté une réaction séro-allergique positive, 5 étaient dues uniquement au test Coombs et la 6-e à la réaction de fixation du complément (RFC).

Basés sur ces résultats, nous considérons que le test Coombs étant beaucoup plus sensible que la réction Wright, doit être introduit comme méthode de routine pour le dépistage de la brucellose dans tous les laboratoires des centres anti-épidémiques et particulièrement pour tous les échantillons de sang envoyés par les hôpitaux en vue du diagnostic de la brucellose.

Des faits exposés on peut constater la nécessité de poursuivre l'apparition et la persistance des anticorps par rapport à l'état allergique et à l'installation de l'immunité, ce critérium permettant d'apprécier la valeur des différentes réactions sérologiques.

II. *Recherches sur l'appartition et la persistance des anticorps.* Afin de déterminer l'apparition et la persistance des anticorps, on a examiné dans les abattoirs A., S., et T., à plusieurs reprises, un certain nombre d'ouvriers, comme suit: 51 personnes ont été soumises à 3 examens au cours de 18 mois et les autres 135, à deux examens à intervalle d'une année.

A. — Les résultats obtenus sur les 51 personnes examinées à 3 reprises ont été répartis en deux groupes: les données du premier groupe (47 cas) comprenant 6 catégories sont consignées dans le tableau VI; les résultats des autres 4 cas, discutés séparément à cause de la modification de la réactivité de l'organisme au cours des 3 examens successifs, sont relatés dans le tableau VII.

Tableau VI

Résultats obtenus sur 47 cas examinés à 3 reprises dans l'intervalle d'une année et demi (Abattoir A)

Catégorie	Cas numéro	Personnes	Examens	IDR positives	Réactions sérologiques			
					Wright	Huddleson	RFC	Coombs
I. Réactions négatives aux 3 examens effectués	1—33	33 personnes	1	—	—	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—
II. Réactions positives aux 3 examens effectués	34	S.P.	1	+++	—	1/400	++++	—
			2	+++	1/200	1/100	—	—
			3	+++	1/200	1/100	—	—
	35	R.C.	1	+++	—	1/400	—	—
			2	++	1/200	—	—	—
			3	+++	—	1/50	—	—
III. Réactions positives au 1-er examen, négatives aux deux autres	36	M.C.	1	—	—	1/400	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—
	37	B.A.	1	—	—	1/400	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—
	38	A.D.	1	—	—	1/100	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—
	39	S.A.	1	—	—	1/100	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—
	40	G.D.	1	—	1/100	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	—

Tableau VI (suite)

Catégorie	Cas numéro	Personnes	Examens	IRD positives	Reactions sérologiques			
					Wright	Huddleson	RFC	Coombs
IV. Réactions positives aux 2 premiers examens, négatives au dernier.	41	V.M.	1	—	1/100	—	—	—
			2	—	—	—	—	1/100
			3	—	—	—	—	—
	42	C.I.	1	—	—	1/400	++	—
			2	—	—	—	—	1/200
			3	—	—	—	—	—
V. Réactions positives au premier et au dernier examen, négatives au second.	43	K.T.	1	—	—	—	—	1/100
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	1/100
VI. Réactions négatives aux 2 premiers examens, positives au dernier.	44	P.F.	1	—	—	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	+++	1/100
	45	B.T.	1	—	—	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	—	—	—	—	1/200
	46	N.D.	1	—	—	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	+	—	—	—	—
	47	K.D.	1	—	—	—	—	—
			2	—	—	—	—	—
			3	++	—	—	—	—

Les résultats obtenus, consignés dans le tableau VI, permettent les constatations suivantes:

I. Réactions négatives aux 3 exames . . . . . 33 cas

II. Réactions positives aux 3 examens

séro-allergiques . . . . . 2 cas
sérologiques . . . . . — cas
allergiques . . . . . — cas

III. Réactions positives aux I-er examen, négatives aux 2 autres

séro-allergiques . . . . . — cas
sérologiques . . . . . 5 cas
allergiques . . . . . — cas

IV. Réactions positives aux 2 premies examens, négatives au dernier.

séro-allergiques . . . . . — cas
sérologiques . . . . . 2 cas
allergiques . . . . . — cas

V. Réactions positives au premier et au dernier examen, négatives au second.

séro-allergiques . . . . . — cas
sérologiques . . . . . 1 cas
allergiques . . . . . — cas

VI. Réactions négatives aux 2 premiers examens, positives au dernier.

séro-allergiques . . . . . — cas
sérologiques . . . . . 2 cas
allergiques . . . . . 2 cas

Tableau VII

Résultats obtenus dans les cas présentant une réactivité modifiée aux 3 examens successifs

Cas	Réaction allergique	Réactions sérologiques			
	I.D.R.	Wright	Huddleson	R.F.C.	Coombs
T.F.	—	—	—	++	—
	++	—	—	—	—
	++	—	—		—
D.A.	—	—	—	++	—
	—	—	—	—	—
	++	1/50	—	—	—
M.I.	—	—	—	—	—
	±	1/50	—	—	—
	++	—	—	—	—
T.I.	++	1/100	1/400	—	—
	++	1/200	—	++	—
	—	—	1/200	++	1/100

Des données du tableau VII on observe que dans les deux premiers cas la RFC a été seule positive au premier examen, indiquant le passage vers l'immunité; les deux autres examens, effectués un an après, montrent l'installation de l'allergie.

Dans le troisième cas, on a surpris le moment de l'infection et celui de l'installation de l'allergie.

Dans le quatrième cas on a constaté la disparition de l'état allergique et par contre, une persistance des réactions sérologiques, indiquant une exacerbation de l'acuité.

Analysant les données des tableaux VI et VII on peut également constater que les 5 malades trouvés positifs au premier examen et négatifs au dernier, ainsi que les deux autres malades trouvés positifs au cours des premiers deux examens et négatifs au dernier, ont guéri soit à la suite du traitement, soit par un processus d'autostérilisation spontanée.

De même, on remarque l'apparition pendant cet intervalle de 4 nouveaux cas positifs, dont 2 ont eu des réactions allergiques, représentant indubitablement de nouvelles infections.

B. Les résultats obtenus sur les 135 personnes examinées à deux reprises à 12 mois d'intervalle, ont été répartis en deux groupes: les données du premier groupe (125), comprenant 4 catégories, sont consignées dans le tableau VIII; les résultats des autres 10 cas qui ont présenté une réactiyité modifée de l'organisme, sont relatés dans le tableau IX.

Tableau VIII

Résultats obtenus sur 125 cas examinés à 2 reprises à intervalle de 6 mois (Abattoir A) et de 12 mois (Abattoirs S et T).

Catégorie	Cas numéro	Abattoir	Personnes	Examens	IDR positives	Réactions sérologiques			
						Wright	Huddleson	RFC	Coombs
I. Réactions négatives aux 2 examens	1—33	A	33 personnes	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	34—54	S	21 personnes	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	55—67	T	13 personnes	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
II. Réactions positives aux 2 examens	68	T	V.V.	1	+	—	1/100	—	—
				2	+	—	—	—	1/100
	69	A	Z.P.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	1/200
	70	A	B.I.	1	—	1/200	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	1/200
	71	A	Z.I.	1	—	—	—	—	1/100
				2	—	1/100	—	—	—
	72	A	T.I.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	1/200
	73	S	C.I.	1	—	—	—	—	1/50
				2	—	1/100	—	—	—
	74	S	I.L.	2	—	1/100	—	—	—
				1	—	1/200	—	—	—
	75	T	H.V.	1	—	—	1/50	++	—
				2	—	—	—	+++	—
	76	S	S.A.	1	+	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	—
	77	S	P.C.	1	+++	—	—	—	—
				2	+++	—	—	—	—
	78	T	M.A.	1	+++	—	—	—	—
				2	++	—	—	—	—
	79	T	T.A.	1	+++	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	—
III. Réactions positives aux premiers examens et négatives au second	80	T	A.L.	1	+	1/100	—	-	—
				2	—	—	—	—	—
	81	T	D.L.	1	+	—	—	++++	—
				2	—	—	—	—	—
	82	T	I.S.	1	+	1/50	—	++	—
				2	—	—	—	—	—
	83	T	T.C.	1	+	1/50	1/100	+++	—
				2	—	—	—	—	—

Tableau VIII (suite)

Catégorie	Cas numéro	Abattoir	Personnes	Examens	IDR positives	Réactions sérologiques			
						Wright	Huddleson	RFC	Coombs
III. (suite)	84	T	P.G.	1	+	—	—	+++	—
				2	—	—	—	—	—
	85	T	T.D.	1	+++	1/50	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	86	A	B.M.	1	—	—	1/400	—	1/100
				2	—	—	—	—	—
	87	A	M.F.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	88	A	D.T.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	89	A	E.A.	1	—	1/50	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	90	A	C.I.	1	—	1/50	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	91	A	W.E.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	92	A	A.G.	1	—	—	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	93	A	S.C.	1	—	1/50	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	94	A	E.I.	1	—	—	—	—	1/100
				2	—	—	—	—	—
	95	A	H.A.	1	—	—	—	—	1/100
				2	—	—	—	—	—
	96	A	D.A.	1	—	1/100	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	97	A	D.R.	1	—	1/50	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	98	A	P.D.	1	—	1/200	1/400	—	—
				2	—	—	—	—	—
	99	S	D.I.	1	—	—	—	—	1/200
				2	—	—	—	—	—
	100	S	T.I.	1	—	—	—	—	1/200
				2	—	—	—	—	—
	101	T	G.V.	1	—	—	1/100	—	—
				2	—	—	—	—	—
	102	T	V.A.	1	—	1/100	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	103	T	T.G.	1	—	—	1/100	—	—
				2	—	—	—	—	—
	104	T	C.R.	1	—	1/50	1/50	+++	—
				2	—	—	—	—	—

Tableau VIII (suite)

Catégorie	Cas numéro	Abattoir	Personnes	Examens	IDR positives	Réactions sérologiques			
						Wright	Huddleson	RFC	Coombs
III. (suite)	105	T	B.P.	1	—	—	1/100	—	—
				2	—	—	—	—	—
	106	T	C.L.	1	—	—	1/50	+++	—
				2	—	—	—	—	—
	107	S	H.E.	1	+	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	108	S	V.M.	1	+	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	109	T	D.G.	1	+	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	110	T	E.S.	1	+	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
	111	T	M.I.	1	+	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	—
IV. Réactions négatives aux premiers examens et positives au second.	112	S	M.R.	1	—	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	1/50
	113	S	M.E.	1	—	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	1/100
	114	A	C.S.	1	—	—	—	—	—
				2	—	1/100	1/100	+++	—
	115	A	P.M.	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	1/100
	116	A	V.I.	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	++	—
	117	S	N.M.	1	—	—	—	—	—
				2	—	1/50	1/100	—	—
	118	S	T.M.	1	—	—	—	—	—
				2	—	1/100	1/100	—	—
	119	T	T.M.	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	1/200	—	—
	120	T	D.I.	1	—	—	—	—	—
				2	—	—	—	—	1/100
	121	A	C.C.	1	—	—	—	—	—
				2	+++	—	—	—	—
	122	A	F.I.	1	—	—	—	—	—
				2	+++	—	—	—	—
	123	S	K.A.	1	—	—	—	—	—
				2	++	—	—	—	—
	124	S	G.V.	1	—	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	—
	125	T	B.I.	1	—	—	—	—	—
				2	+	—	—	—	—

Les résultats obtenus, consignés dans le tableau VIII, permettent les conclusions suivantes:

I. Réactions négatives aux 2 examens . . . . . .67 cas
II. Réactions positives aux 2 examens
séro-allergiques . . . . . 1 cas
sérologiques . . . . . 7 cas
allergiques . . . . . 4 cas
III. Réactions positives au premier et négatives au second examen
séro-allergiques . . . . . 6 cas
sérologiques . . . . . .21 cas
allergiques . . . . . 5 cas
IV. Réactions négatives au premier examen et positives au second
séro-allergiques . . . . . 2 cas
sérologiques . . . . . 7 cas
allergiques . . . . . 5 cas

Tableau IX

Résultats obtenus dans les cas présentant une réactivité modifiée aux 2 examens successifs.

No. crt.	Abattoir	Noms personnes	Réaction allergique	Réactions sérologiques			
			I.D.R.	Wright	Huddleson	R.F.C.	Coombs
1	A.	R.T.	— +++	1/50 1/100	1/400 —	— —	— —
2	A.	N.P.	++ ++	— —	— —	— —	— 1/200
3	S.	C.A.	+++ +++	— —	— —	— —	1/100 —
4	S.	M.I.	+ ++	— —	— —	— —	1/100 —
5	S.	M.G.	++ ++	— —	— —	++ —	— —
6	S.	T.I.	+++ +++	— —	— —	— —	1/100 —
7	T.	M.V.	++ —	1/50 1/100	— —	— —	— —
8	T.	T.M.	+ —	1/50 1/200	1/50 —	+++ —	— —
9	T.	V.A.	+++ —	— 1/200	— —	— —	— —
10	T.	K.E.	+ +	1/50 —	— —	++ —	— —

Des données du tableau IX, il résulte que les 10 personnes à réactivité modifiée de l'organisme ont présenté les particularités suivantes:

— le cas No.1 a permis de surprendre le moment de l'installation de l'allergie;

— les cas No.7, 8 et 9 ont présenté la négativation de l'IDR et par contre l'apparition ou l'accentuation des réactions sérologiques, permettant de préciser l'acuité du processus latent;

— le cas No.2, qui entre dans la même catégorie que la précédente, présente l'apparition des anticorps blocants (Coombs), bien que l'état allergique se soit maintenu;

— les cas Nos.3, 4, 5, 6 et 10 ont présenté la disparition des anticorps blocants et fixateurs, la persistance de l'allergie indiquant l'installation de l'immunité.

Analysant les données des tableaux VIII et IX, on constate en plus:

1. Chez 32 personnes les réactions se sont négativées; 11 de ces cas ont également présenté la disparition de l'allergie, prouvant indiscutablement la guérison biologique, survenue soit à la suite du traitament, soit par auto-stérilisation spontanée;

2. Dans l'intervalle de 12 mois, on a observé en plus, l'apparition de 14 résultats positifs, dont 7 ont eu une réaction allergique, pouvant être considérés comme de nouvelles infections survenues durant cet intervalle.

3. Il est intéressant de constater que chez 9 cas les examens successifs ont présenté une alternance des réactions Wright, Huddleson et Coombs; de même, 4 autres cas qui présentaient à l'un des examens un état d'allergie et le test Coombs positif, à l'examen ultérieur n'ont plus montré qu'une réactivité allergique.

Selon CARREL et RENOUX, les anticorps univalents précèdent au cours des infections récentes l'apparition des agglutinines, et persistent plusieurs années après la guérison clinique. Le test Coombs, dans nos investigations, doit être interprété de la même manière.

CONCLUSIONS

1. L'examen de 167 ouvriers des abattoirs J., L., R. et S. a permis de constater que l'incidence des formes latentes et chroniques de brucellose varie, d'un abattoir à l'autre, en fonction des conditions épidémiologiques locales, atteignant un maximum de 23,7% parmi les employés de l'abattoir S., étant complètement absente parmi ceux de l'abattoir R.

2. On étudié dans ces abattoirs, le pourcentage de positivité en fonction du spécifique du travail, de l'âge et du stage professionnel.

Les réactions positives ont été trouvées chez les médecins vétérinaires, les bouchers, les charcutiers, les cuisinières, les blanchisseuses, les garçons d'écurie et, ce qui est le plus intéressant, parmi les mécaniciens (3 cas sur 17).

Le groupe d'âge le plus fréquemment atteint a été de 45 à 50 ans, suivi par celui entre 21 et 30 ans; l'indice le plus élevé de contamination a été trouvé dans les premières cinq années de travail.

3. On a constaté une divergence nette, non seulement entre les réactions allergiques et sérologiques, mais aussi entre les différentes réactions sérologiques elles-mêmes, fait explicable par la pathogénie et l'évolution de la brucellose, ainsi que par l'existence des anticorps univalents.

4. L'application du test Coombs a permis d'obtenir un pourcentage plus élevé de résultats positifs, raison pour laquelle nous recommandons ce test comme méthode de routine dans tous les cas suspects de brucellose.

5. Parmi 42 personnes accusant des douleurs rhumatismales, 18 ont eu des réactions positives, ce qui nous permet de recommander la recherche de l'étiologie brucellique chez les personnes rhumatiques provenant du milieu agricole, du personnel vétérinaire ou des sujets qui travaillent avec des matières premières d'origine animale.

6. Le contrôle des réactions allergiques et sérologiques, effectué pendant 2 années successives chez 186 employés des abattoirs A., S. et T., a montré que les manifestations sérologiques ne sont pas constantes, certaines réactions étant positives la première année et d'autres l'année suivante; on a remarqué surtout l'alternance entre la réaction Wright et le test Coombs. De même, en ce qui concerne l'intradermoréaction à la brucelline et ses résultats, on remarque des différences en fonction de l'acuité et de la chronicité du processus.

Par conséquent, nous considérons que pour dépister la brucellose, il faut appliquer l'examen séro-allergique complexe, utilisant toutes les réactions sérologiques connues.

7. Des personnes positives au premier examen, 38 sont devenues ultérieurement négatives soit à la suite d'un traitement, soit par un processus d'autostérilisation spontanée; il se peut que dans certains cas, la spécificité des diverses réactions sérologiques puisse prêter à discussion.

8. On a également dépisté 18 nouveaux cas positifs, dont 9 ont présenté aussi des réactions allergiques, pouvant être considérées indubitablement comme de nouvelles infections.

BIBLIOGRAPHIE

1. Pop Al. et Isac B. — Brucellose humaine. Ed. Med. Buc., 1954.
2. Pop Al., Dimitriu O. et Vasilescu T. — Microb., Paraz. Epid., 1956, **1**, 611.
3. Dimitriu O., Pop Al., Vasilescu Th, Dogariu Tr. et Dimitriu-Iancopoll. Arh. romîne de Epid. şi Microb., 1956, 311.
4. Zalman M., Gherman D., Reichrath S., Bacila E., David P., Olariu G., Costin I. et Vines V. — Comm. S.S.M., Section d'Hygiène, Avril 1956.
5. Zalman M., Gherman D., Reichrath S., Élias A., Bacila A., David P., Olariu G., Costin I., Vines V., Lustrea V. et Alexandrescu N. — Comm. « Jours Méd. » — Reg. Timişoara, Juillet, 1956.
6. Ostrovskaia N.N., — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Imunobiol., 1955, Nr. 5 99.
7. Renoux G. — Ann. Inst. Pasteur, 1950, **78,798** et 1954, **86,112.**
8. Zdrodovski P.P. — La brucellose, — Medghiz, 1951, Moscova.

ЗНАЧЕНИЕ ДИНАМИЧЕСКОГО НАБЛЮДЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ И АЛЛЕРГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ И ЛАТЕНТНЫХ ФОРМАХ БРУЦЕЛЛЕЗА

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В течение 1957 г. авторы исследовали 167 рабочих на бойнях Ж.Л.Р. и С. и спустя 1 год они исследовали динамику аллергической, серологической реактивности организма у других 186 рабочих на бойнях А. и Т.

Было установлено, что частота латентных и хронических форм бруцеллоза варьирует в различных бойнях в зависимости от местных эпидемиологических условий, причем наиболее высокий показатель заражения отмечается в течение первых 5 лет работы.

Были отмечены часто расхождения между результатами серологических и аллергических реакций и даже между различными серологическими реакциями, что можно объяснить развитием бруцеллеза как такового, а также и частотой блокирующих антител при этой инфекции.

Исследуя дважды 135 рабочих и трижды — других 51 рабочих, авторы могли установить изменения реактивности организма только у 14 из них.

Путем этих повторных последовательных медицинских исследований можно установить момент наступления состояния аллергии, обострения хронического процесса, момент биологического выздоровления организма, а также и появление новых случаев.

Пользуясь этим методом, можно оценить действенность лечения, а также и примененных профилактических мер.

DIE BEDEUTUNG DER DYNAMISCHEN VERFOLGUNG VERSCHIEDENER SEROLOGISCHEN UND ALLERGISCHEN REAKTIONEN BEI CHRONISCHEN UND LATENTEN FORMEN VON BRUZELLOSE

ZUSAMMENFASSUNG

Während des Jahres 1957 untersuchten die Verfasser 167 Arbeiter aus den Schlachthäusern J., L., R., und S. und prüften den Verlauf der allergischen und serologischen Reaktionsweise im Abstand von einem Jahr bei weiteren 186 Arbeitern aus den Schlachttäusern A. und T.

Es wurde festgestellt, dass die Häufigkeit der latenten und chronischen Bruzelloseformen in den verschiedenen Schlachthäusern, in Abhängigkeit von den örtlichen epidemiologischen Bedingungen schwankt und dass der höchste Ansteckungsindex während der ersten 5 Arbeitsjahren auftritt.

Zwischen den allergischen und den serologischen und sogar zwischen verschiedenen serologischen Reaktionen bestand oftmals keine Übereinstimmung, was sich durch den Ablauf der Bruzellose selbst sowie durch das häufige Vorkommen von blockierenden Antikörpern bei dieser Infektion erklären lässt.

Durch zweimalige Untersuchung von 135 und dreimaliger Untersuchung von weiteren 51 Arbeitern, konnten die Verfasser eine Änderung der Reaktionsweise bei 14 Personen feststellen.

Vermittels solcher aufeinanderfolgenden Untersuchungen kann der Augenblick, in dem der allergische Zustand einsetzt, der chronische Prozess akut wird oder biologische Heilung des Organismus eintritt sowie das Auftreten neuer Fälle erfasst werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es daher möglich, die Wirksamkeit einer Behandlung sowie der getroffenen prophylaktischen Massnahmen zu beurteilen.

THE IMPORTANCE OF A DYNAMICAL FOLLOW-UP OF THE VARIOUS SEROLOGICAL AND ALLERGIC REACTIONS IN CHRONIC AND LATENT FORMS OF BRUCELLOSIS

SUMMARY

During the year 1957 the authors examined 167 workers from the J., L., R., and S. slaughter houses and investigated the development of allergic and serological responsiveness at one year's interval in another 186 workers from the slaughter houses A. and T.

The incidence rate of latent and chronic forms of brucellosis was found to vary from one slaughter house to another in relation to the local epidemiological conditions. The highest index of contamination was recorded in subjects during their first 5 years of service.

A certain degree of divergence was found to exist between allergic and serological, and even between the different types of serological reactions. This may be accounted for by the course of brucellosis itself as well as by the high incidence rate of blocking antibodies in this infection.

By twice investigating 135 workers and thirce testing another 51, the authors found the responsiveness of the body to have changed in 14 subjects.

The moments when the allergic condition sets in, when chronic processes become acute, when biological recovery of the body occurs, or when new cases appear, may be detected by means of these succesive re-examinations.

Hence, by this method, the efficiency of treatment as well as of the prophylactic steps adopted may be estimated.

LE VACCIN ASSOCIÉ DIPHTÉRO-TÉTANO-PERTUSSIS

Note II. RÉACTIONS POST-VACCINALES ET RÉPONSE IMMUNOLOGIQUE CHEZ LES ENFANTS VACCINÉS

par

Gh. Calalb
Ecaterina Stănică
H. Kranzdorf
Alice Saragea
Paula Maximesco
Cecilia Stoian
(Service de la Diphtérie)

Elena Poenaru
Mira Esrig
M. Lazăr
N. Lașco
(Service du Tétanos)

N. Pozsgi
Viorica Andreescu-Țigoiu
(Service de B. Pertussis)

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », avec la collaboration de :

L. Fotesco, C. Dumitresco, P. Popesco, Georgeta Aldea, Adriana Antonesco, Cornelia Barbu, Dora Brener, V. Călinesco, I. Caniola, G. Cărăușu, Cristina Ciocan, Speranța Mănesco, Veronica Costea, B. Csiky, Cezara Dafinesco, Sevastița Dumitresco, Feiga Ianoglu, J. Lăzăresco, St. Milicesco, M. Mocanu, Monica Nicolau
Section Sanitaire Antiépidémique de la Région de Bucarest)

— Manuscrit reçu le 22 mars 1961 —

Dans une note antérieure (5), nous avons exposé les résultats des expériences effectuées sur animaux de laboratoire, qui ont permis d'établir la composition pour 1 ml du trivaccin diphtéro-tétano-pertussis adsorbé:

50 Lf anatoxine diphtérique
20 U.B. anatoxine tétanique
60 U.O.I. *B. pertussis*
6 mg PO_4Al.

Ce vaccin associé, qui commence à être appliqué sur le terrain, est destiné à remplacer, au fur et à mesure, le P.T.A.P. diphtérique dans les vaccinations obligatoires. La primo-vaccination sera appliquée à des enfants âgés de 4 à 6 mois, le premier rappel à l'âge de 1 1/2 ans, le second à 3 ans, le troisième rappel à l'âge de 7 ans ne s'effectuant plus qu'avec le bivaccin diphtéro-tétanique (3, 4).

Le présent travail montre les résultats obtenus du point de vue réaction post-vaccinale et réponse immunologique chez les enfants vaccinés avec ce trivaccin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La réaction Schick a été pratiquée sur 1072 enfants du milieu rural, âgés de 4 à 18 mois (sélectionnés du point de vue contre-indications pour la vaccination au trivaccin), en enregistrant 396 enfants Schick positifs (36,9%).

Tableau I

Intervalle de temps	Groupe d'âge	Antitoxine diphtérique Unités internationales			Antitoxine tétanique Unités internationales			Agglutinines B. pertussis			Total des titrages triples simultanés		
		maximum	moyenne	minimum	maximum	moyenne	minimum	maximum	moyenne	minimum	antitoxine diphtérique	antitoxine tétanique	agglutinines B. pertussis
5 semaines après la vaccination (3 inoc.)	4 à 18 mois	45	4,673	0,3	25	2,619	0,075	1/2560	1/700	1/160	136	140	124
6 mois après la vaccination (avant le rappel)	»	25	4,58	0,3	5	0,829	0,075	1/640	1/38	0	112	99	111
2 mois après le rappel	»	25	7,468	0,75	25	6,56	1	1/10240	1/685	1/40	78	59	77

Tous les enfants (Schick positifs ou négatifs) ont été vaccinés par trois inoculations de 0,5 ml trivaccin, effectuées à intervalles de 30 jours. La dose totale de 1,5 ml trivaccin contient:

75 Lf anatoxine diphtérique (approx. 300 U.I.)
30 U.B. anatoxine tétanique
90 U.O.I. *B. pertussis*
9 mg PO_4Al

Les inoculations ont été faites strictement par voie intramusculaire, dans la région supéro-externe de la cuisse.

Cinq semaines après la dernière inoculation, on a pratiqué la réaction Schick de contrôle sur les 396 enfants, initialement Schick positifs; en plus, chez 140 d'entre eux on a récolté du sang de la veine jugulaire en vue de titrer les anticorps. Avant le premier rappel (6 mois après la vaccination) on a de nouveau récolté des épreuves de sang chez 112 enfants et finalement (2 mois après le rappel) d'autres épreuves, de 78 enfants.

Le titrage des antitoxines diphtérique et tétanique a été exécuté selon la méthode Ehrlich (utilisant des fractions de Lt d'après Ramon) et le titrage des agglutinines suivant la méthode de FLOSSDORF (9).

Nous nous proposons de continuer chez ces enfants le contrôle de la dynamique des anticorps, par rapport au second et troisième rappel et de noter les données nécessaires à l'épreuve épidémiologique.

Tableau II

U.A/ml	Antitoxine diphtérique						Antitoxine tétanique					
	5 semaines après la vaccination		6 mois après la vaccination (avant le rappel)		2 mois après le rappel		5 semaines après la vaccination		6 mois après la vaccination (avant le rappel)		2 mois après le rappel	
	nombre des sérums	%	nombre des sérums	%	nombre des sérums	%	nombre des sérums	%	nombre des sérums	%	nombre des sérums	%
0,075	—	—	—	—	—	—	1	0,71	1	1,01	—	—
0,1	—	—	—	—	—	—	1	0,71	3	3,03	—	—
0,3	1	0,73	1	0,89	—	—	4	2,85	15	15,15	—	—
0,35	1	0,73	—	—	—	—	2	1,42	—	—	—	—
0,5	1	0,73	7	6,25	—	—	7	5,00	18	18,18	—	—
0,66	1	0,73	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0,75	1	0,73	2	1,78	1	1,28	6	4,28	21	21,21	—	—
0,85	1	0,73	4	3,57	—	—	—	—	—	—	—	—
1	6	4,41	4	3,57	—	—	9	6,42	14	14,14	1	1,69
1,5	1	0,73	8	7,14	4	5,12	7	5	11	11,11	—	—
2	10	7,35	12	10,71	5	6,41	13	9,28	3	3,03	2	3,39
2,5	—	—	5	4,46	—	—	16	11,42	4	4,04	—	—
3	15	11,02	1	0,89	2	2,56	19	13,57	5	5,05	7	11,86
3,5	7	5,14	7	6,25	5	6,41	—	—	—	—	—	—
4	3	2,20	8	7,14	1	1,28	6	4,28	1	1,01	5	8,47
5	34	25,00	19	16,96	11	14,10	24	17,14	2	2,02	9	15,25
6	10	7,35	9	8,03	1	1,28	3	2,14	—	—	6	10,16
7,5	18	13,23	7	6,25	14	17,94	1	0,71	—	—	4	6,78
8	—	—	—	—	—	—	2	1,42	—	—	6	10,16
9	2	1,47	2	1,78	—	—	1	0,71	—	—	2	3,39
10	10	7,35	3	2,67	8	10,25	6	4,28	—	—	2	3,39
11	1	0,73	4	3,57	—	—	3	2,14	—	—	2	3,39
12	1	0,73	4	3,57	2	2,56	5	3,57	—	—	3	5,08
14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4	6,78
15	8	5,88	3	2,67	9	11,53	2	1,42	—	—	2	3,39
17	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1,69
20	1	0,73	—	—	7	8,97	1	0,71	—	—	2	3,39
25	—	—	2	1,78	8	10,25	1	0,71	—	—	1	1,69
30	1	0,73	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
45	2	1,47	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
50	—	—	—	—	—	—	—	—	1	1,01	—	—

RÉSULTATS

1. *Les réactions* post-vaccinales, locales et générales constatées chez 1072 enfants étaient très modérées; 10,35% des enfants vaccinés présentaient au point d'inoculation un léger érythème ou une infiltration, qui cédait 1 ou 2 jours après l'inoculation; 12,25% des enfants inoculés ont présenté le jour de l'inoculation une température rectale de 38°—39°C, revenant à la normale le lendemain, et 0,28% des cas, des vomissements.

En général, les réactions post-vaccinales ont été observées après la répétition des inoculations (2-e et 3-e inoculation).

2. *Efficacité. a)* La réaction Schick de contrôle, pratiquée 5 semaines après la vaccination, a montré qu'aucun des 396 enfants Schick-positifs vaccinés ne présentaient plus la réaction positive, ce qui indiquait une conversion 100% de la réaction Schick.

b) Le titrage de l'antitoxine diphtérique, de l'antitoxine tétanique et des agglutinines anti-pertussis dans le sang des enfants vaccinés a donné, 5 semaines après la primo-vaccination (3 inoculations), 6 mois après (avant le premier rappel) et 2 mois après le rappel les valeurs maxima, moyennes géometriques et minima, exposées dans le tableau I.

Les résultats de ces titrages sont exposés en détail dans les tableaux II et III où l'on peut constater le nombre et le pourcentage des sérums examinés qui ont donné certains titres.

Tableau III

Titre agglutinant	5 semaines après la vaccination		6 mois après la vaccination (avant le rappel)		2 mois après le rappel	
	Nombre des sérums	%	Nombre des sérums	%	Nombre des sérums	%
0	—	—	24	21,62	—	—
1/40	—	—	25	22,52	1	1,29
1/80	—	—	24	21,62	2	2,59
1/160	11	8,87	24	21,62	7	9,09
1/320	18	14,51	12	10,81	10	12,98
1/640	31	25,00	2	1,80	19	24,67
1/1280	54	43,54	—	—	30	38,96
1/2560	10	8,06	—	—	5	6,49
1/5120	—	—	—	—	2	2,59
1/10240	—	—	—	—	1	1,29

Les résultats de ces recherches ont révélé chez les enfants vaccinés par 3 inoculations de vaccin D.T.P. (indépendamment de l'âge — 4 à 18 mois) 5 semaines après la dernière inoculation, la présence des anticorps, à des titres comparables, et toujours de beaucoup supérieurs aux chiffres limites, qui confèrent la protection, respectivement 1/30 UAI/ml pour la diphtérie, 1/100 UAI/ml pour le tétanos et des agglutinines à un titre de 1/160 pour la coqueluche (4, 6, 10).

Quant au contrôle de l'efficacité du composant *B. pertussis* du vaccin associé par le test d'agglutination dans le sérum des enfants immunisés, on admet

généralement une corrélation entre le titre des agglutinines et la protection clinique, du moins dans le cas des vaccins corpusculaires (14, 16).

Comparant les résultats enregistrés avec le trivaccin préparé par nous (tableau I) avec les données d'un travail récent de ZOURBAS (17), on constate que les titres antitoxiques obtenus à l'aide de notre vaccin sont d'au moins deux fois plus élevés pour l'antitoxine diphtérique et un peu plus élevés pour l'antitoxine tétanique.

En ce qui concerne le composant *B. pertussis*, 5 semaines après la vaccination, les titres agglutinants obtenus par ZOURBAS dépassent les chiffres enregistrés par nous.

A un intervalle de 6 mois après la vaccination, la moyenne des titres se maintient au même niveau pour l'antitoxine diphtérique, elle diminue à 1/3 pour l'antitoxine tétanique et diminue considérablement pour les agglutinines *B. pertussis*.

Toutefois, les titres minima enregistrés dépassent de 10 fois la limite de protection pour la diphtérie et de 7 fois pour le tétanos (tableau II). En échange, pour les agglutinines *B. pertussis* (tableau III), 65,76% des sérums examinés ont donné des titres au-dessous de la limite de protection (1/160).

Ces constatations justifient, une fois de plus, l'application des inoculations de rappel.

En effet, 2 mois après le rappel, la moyenne des titres augmente, par rapport à la moyenne obtenue 5 semaines après la vaccination, de 59% pour l'antitoxine diphtérique et de 150% pour l'antitoxine tétanique (tableau I). La moyenne des titres des agglutinines *B. pertussis* revient — après le premier rappel — aux chiffres initiaux (tableau I); en même temps, le pourcentage des sérums avec titres d'agglutinines dépassant la limite de protection, augmente de 34,25% à 96,12% (tableau III). Les pourcentages des sérums contenant moins d'une unité antitoxine diphtérique (tableau II) sont également significatifs, ces pourcentages étant de 4,38% après la vaccination, de 12,49% avant le rappel et de 1% après le rappel. L'antitoxine tétanique à titre inférieur à 1 UAI/ml a été trouvée dans une proportion de 14,97% après la vaccination, de 18,58% avant le rappel et de 0 après le rappel.

Les titres moyens des antitoxines, très élevés après la dose de rappel, prouvent que les titres des anticorps obtenus à la suite de la primo- immunisation ne peuvent être considérés comme unique critérium dans l'appréciation du pouvoir antigénique du vaccin.

En dehors de ces faits qui se rapportent au total des épreuves de sang récolté pour la mise en évidence de la dynamique des anticorps proprement dite, on n'a pris en considération pour chaque antigène que le lot formé par les mêmes enfants, dont on possédait des épreuves de sang et les titres respectifs, effectués 5 semaines après la vaccination, 6 mois après la vaccination (avant le rappel) et 2 mois après le rappel.

Dans ces conditions, il a été possible de sélectionner un lot de 65 enfants afin de poursuivre la dynamique pour l'antitoxine diphtérique, un lot de 44 enfants pour l'antitoxine tétanique et un troisième de 57 enfants pour les agglutinines *B. pertussis*.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IV.

Tableau IV

Intervalle de temps	Groupe d'âge	Antitoxine diphtérique. U.I.A./ml.	Antitoxine tétanique U.I.A./ml	Agglutinines B. pertussis	Total des titrages triples simultanés		
		moyenne géométrique	moyenne géométrique	moyenne géométrique	antitoxine diphtérique	antitoxine tétanique	agglutinines B. pertussis
3 semaines après la vaccination (3 inoc.)	4 à 18 mois	3,856	2,6369	1/991,59	65	44	57
6 mois après la vaccination (avant le rapel)	4 à 18 mois	3,8108	0,79607	1/32,995	65	44	57
2 mois après le rappel	4 à 18 mois	7,555	6,275	1/790	65	44	57

Les résultats exposés dans le tableau IV, sont très proches de ceux obtenus sur le total des sérums (tableau I) en ce qui concerne la moyenne géométrique des titres antitoxiques. Ils indiquent l'acquisition d'une immunité solide, qui pourrait permettre l'espacement des rappels.

La moyenne du titre des agglutinines *B. pertussis* présente, 5 semaines après la vaccination ainsi qu'après le rappel, des résultats plus favorables, à juger d'après les calculs qui établissent la dynamique des anticorps (tableau IV). Six mois après la vaccination, cette même moyenne demeure toutefois très réduite (1/33), démontrant qu'une application systématique des rappels s'impose afin d'assurer la protection vis-à-vis de la coqueluche chez les enfants âgés de $1^1/_2$ à 3 ans. Ces résultats satisfaisants ne peuvent cependant être obtenus que par l'utilisation des trivaccins purifiés et adsorbés sur support minéral, ainsi que nous l'avons constaté nous-mêmes, dans les recherches expérimentales sur animaux de laboratoire (5) et nombre d'autres auteurs, au cours des immunisations chez les enfants (6, 7).

Zourbas (17) a poursuivi dans les crèches du Département de la Seine, en 1954—1958, la morbidité par la coqueluche chez les nourrissons vaccinés, comparativement avec le trivaccin adsorbé et non-adsorbé. Au cours de ces années, 112 sur 8871 enfants, vaccinés avec le trivaccin non-adsorbé, ont fait la coqueluche (morbidité 1,26%), alors que de 8817 enfants vaccinés avec le trivaccin adsorbé, seulement 6 ont fait la maladie (morbidité 0,068%). Ces chiffres révèlent la supériorité indiscutable des vaccins adsorbés par rapport aux vaccins non-adsorbés; ils sont d'autant plus valeureux qu'ils se rapportent à l'épreuve épidémiologique, qui a le dernier mot lorsqu'il s'agit d'apprécier l'efficacité d'un vaccin administré à l'homme.

Un travail antérieur (5) concernant l'expérimentation du trivaccin D.T.P. sur animaux de laboratoire, a montré que la présence de l'antigène *B. pertussis* dans le trivaccin fluide n'a pas une action synergisante nette sur la valeur immunisante de l'antigène diphtérique ou tétanique. Mais, si l'on compare les titres des antitoxines diphtériques et tétaniques chez les enfants vaccinés au bivaccin

diphtéro-tétanique adsorbé sur PO_4Al (4) avec les résultats obtenus par le trivaccin adsorbé, cette action synergisante semble très évidente, du moins chez l'homme. Ainsi, l'immunisation d'un lot d'enfants par le bivaccin D.T. (4) a donné, pour l'antitoxine diphtérique, une moyenne des titres de 1,55 UAI/ml, tandis que par l'immunisation avec le trivaccin, la moyenne était de 4,673 UAI/ml; de même, pour l'antitoxine tétanique le premier cas a donné 0,45 UAI/ml et le second 2,619 UAI/ml.

La discordance entre les résultats des expériences effectuées sur animaux de laboratoire et ceux obtenus sur l'homme, du point de vue de l'action de renforcement que conférerait la présence du composant *B. pertussis* dans la vaccination associée, n'est pas surprenante, vu qu'en ce qui concerne ces vaccins on ne dispose pas encore d'un procédé de laboratoire qui puisse établir un indice sûr des résultats à obtenir chez l'homme (11). On pourrait, par exemple, trouver une explication par le fait que les animaux de laboratoire ont un comportement différent de celui de l'homme vis-à-vis de l'allergène *B. pertussis*. Il faut toutefois tenir compte que dans notre cas, le bivaccin D.T. a été administré aux enfants par deux inoculations, tandis que le D.T.P.a été inoculé par trois injections de 0,5 ml, ce qui explique les différences de titres de l'antitoxine diphtérique et tétanique, d'un vaccin à l'autre.

On remarque, par conséquent, que la vaccination par trois inoculations, effectuées à 30 jours d'intervalle, même dans le cas des vaccins adsorbés, est beaucoup plus indiquée, non seulement en ce qui concerne le composant *B. pertussis*, mais aussi l'anatoxine diphtérique et tétanique.

CONCLUSIONS

La réaction Schick a été appliquée à un lot de 1072 enfants du milieu rural, âgés de 4—18 mois, non-vaccinés contre la diphtérie, le tétanos et la coqueluche, en sélectionnant 396 enfants Schick positifs (36,09%).

— Le lot entier d'enfants (Schick positifs et négatifs) a été vacciné par voie intramusculaire par trois inoculations de 0,5 ml trivaccin D.T.P., préparé selon la formule indiquée.

— Les réactions post-vaccinales locales et générales étaient très modérées du point de vue fréquence et intensité.

— Cinq semaines après la 3-e inoculation de trivaccin, tous les enfants, initialement Schick positifs, ont présenté une conversion de la réaction.

— Le trivaccin D.T.P. expérimenté est doué d'une haute valeur immunogène, pouvant être appréciée d'après les valeurs maxima, moyennes géométriques et minima des titres des antitoxines diphtériques et tétaniques et des agglutinines *B. pertussis*, testées 5 semaines après la vaccination.

— Six mois après la vaccination, le titre moyen reste au même niveau pour l'antitoxine diphtérique, diminue pour l'antitoxine tétanique, se maintient toutefois à un niveau sensiblement supérieur à celui des chiffres limite, assurant la protection, et diminue considérablement pour les agglutinines *B. pertussis*.

Ces résultats accentuent, une fois de plus, la nécessité d'appliquer des injections de rappel, surtout en ce qui concerne la prévention de la coqueluche

— Deux mois après le premier rappel, effectué 6 mois après la vaccination, le titre moyen atteint 7,5 UAI/ml pour l'antitoxine diphtérique, 6,2 UAI/ml pour l'antitoxine tétanique et 1/790 pour *B. pertussis*.

C'est sur la base de ces résultats que le trivaccin est actuellement préparé à l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » et appliqué par le réseau sanitaire anti-épidémique dans les vaccinations obligatoires des enfants âgés de 4 à 6 mois.

— Nous nous proposons de continuer chez ces enfants le contrôle de la dynamique des anticorps, en rapport avec le 2-e et 3-e rappel et d'obtenir les données nécessaires pour l'épreuve épidémiologique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Barrett D. C. et coll. — Am. J. Publ. Health, 1959, **49,** 644.
2. Brown G. et Kendrick L. P. — Rev. Immunol., 1960, **24,** 126.
3. Calalb G. et coll. — Arch Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17,** 545
4. Calalb G. et coll.—Arch Roum. de Path. exp. et de Microbiologie 1959, **18,** 605
5. Calalb G. et coll. — Arch Roum. de Path. exp. et de Microbiologie 1961, **20,** 181
6. Cheve J., Nicolle L., Amoureux G., Girard O. et Zourbas J. — III-e rencontre Internationale de standardisation Biol., Opatija, 1957.
7. Cockburn Ch. — Bull. O.M.S., 1955, **13,** 409.
8. di Sant' Agnese P. A. — Am. J. Publ. Health, 1950, **15,** 674.
9. Flossdorf E. W. — J. Pediatr., 1941, **19,** 638.
10. Girard O., Nicolle L., Cheve J., Amoureux G., Zourbas J. et Caraes Y. — Ann. Inst. Pasteur, 1959, **96,** 491.
11. Holt D. B., Barnes J. M., Bousfield G., Spiller V. et, Croarke F. — Bull. O.M.S., 1959, **20,** 1121.
12. Joo J. et Rethy L. — III-d Internat. meet. of Biol. standardisation, Opatija, 1957.
13. Kudriavțeva N. P. — Pediatria, 1958, No. 2, 30.
14. Lévy F. M. — Séminaire sur la coqueluche — Rev. d'Immunol., 1958, **22,** 285.
15. Remova N. T. — J. Mikrobiol Epidemiol i Immunol 1959, No. 5, 58.
16. Ungar J. — III-d Internat. meet. of Biol. standardisation, Opatija, 1957.
17. Zourbas J. — Rev. d'Immunol., 1960, **24,** 100.

АССОЦИИРОВАННАЯ ДИФТЕРО-СТОЛБНЯЧНАЯ-КОКЛЮШНАЯ ВАКЦИНА

Сообщение 2: РЕАКЦИЯ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ У ВАКЦИНИРОВАННЫХ ДЕТЕЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы применили реакцию Шика на группе, состоящей из 1072 детей в возрасте 6—18 месяцев, проживающих на селе, не привитых против дифтерии, столбняка и коклюша и из которых они отобрали группу в 396 детей с положительной реакцией Шика (36,09%).

Все эти дети (с положительной и отрицательной реакцией Шика) были привиты внутримышечным путем, с введением 0,5 мл тривакцины «Д. Т. П.» (*dyphteria-tetanus-pertussis*), приготовленной согласно установленной формуле. Зарегистрированные после вакцинации местные и общие реакции оказались весьма умеренными, как в смысле их частоты, так и интенсивности.

Спустя 5 недель после третьего введения тривакцины, у всех детей с первоначальной положительной реакцией Шика было констатировано конвертирование реакции.

Экспериментированная авторами тривакцина «Д. Т. П.» оказалась обладающей высокими иммуногенными свойствами, что может быть установлено согласно макси-

мальным значениям, средним геометрическим показателям и минимальным показателям титров дифтерических и столбнячных антитоксинов и агглютининов B. *pertuussis* спустя 5 недель после вакцинации.

Спустя 6 месяцев после вакцинации, средний титр дифтерийного антитоксина созраняется на том же уровне, он снижается в отношении столбнячного антитоксина, оставаясь все же на значительно большем уровне по сравнению с предельными цифрами, обеспечивающие защиту, снижается выраженным образом в отношении агглютининов B. *pertussis*

Эти результаты лишний раз доказывают необходимость применения ревакцинации, в особенности в связи с профилактикой коклюша.

Спустя 2 месяца после первой ревакцинации осуществленной через 6 месяцев после первой вакцинации, средний титр доходит до 7,5 АЕ./мл для дифтерииного антитоксина, до 6,2 АЕ./мл для столбнячного антитоксина и до 1:790 для B. *pertussis*

На основании этих результатов, в настоящее время в Бухарестском Институте имени д-ра И. Кантакузино выпускается тривакцина D.T.P., которая применяется органами противоэпидемической санитарной сети при объязательных прививках детей в возрасте от 4 до 6 месяцев.

Авторы продолжают наблюдение этих детей при помощи контроля динамики антител, во время второй и третьей ревакцинации, регистрируя в то же время данные, необходимые в связи с эпидемиологическими доказательствами действенности тривакцины.

DER KOMBINIERTE DIPHTHERIE-TETANUS-PERTUSSISSCHUTZIMPFSTOFF

II. Mitteilung. IMPFREAKTIONEN UND IMMUNITÄTSREAKTION BEI GEIMPFTEN KINDERN

ZUSAMMENFASSUNG

Bei 1072 auf dem Lande lebenden Kindern im Alter von 4—18 Monaten, die vorher nicht gegen Diphtherie, Tetanus oder Keuchhusten geimpft worden waren, wurde die Schicksche Reaktion durchgeführt und 396 Schick-positive Kinder (36.09%) ausgewählt.

Alle Kinder (Schick-positiv und Schik-negativ) wurden durch die intramuskuläre Verabbreichung von 0,5 ml der nach dem angegebenen Verfahren hergestellten D.T.P.-Trivakzine geimpft.

Die örtlichen und allgemeinen Impfreaktionen waren sowohl was ihre Häufigkeit als auch was ihre Intensität betrifft äusserst mässig.

Fünf Wochen nach der dritten Trivakzineinjektion, wurde bei allen ursprünglich Schick-positiven Kindern ein Umschlag der Reaktion festgestellt.

Die verwendete D.T.P.-Trivakzine besitzt eine hohe immunogene Wirksamkeit, die auf Grund der Maximalwerte, des geometrischen Mittelwertes und der Minimalwerte der Diphterie- und Tetanusantitoxine und der Pertussisagglutinine, 5 Wochen nach der Impfung, beurteilt werden kann.

Sechs Monate nach der Schutzimpfung, erhält sich der durchschnittliche Diphtherieantitoxintiter auf der gleichen Höhe. Der Tetanusantitoxintiter sinkt ab, bleibt aber immer noch weit oberhalb der Schutz gewährenden Grenzwerte, während der Pertussisagglutinintiter bedeutend absinkt.

Diese Ergebnisse weisen nochmals auf die Notwendigkeit wiederholter Impfung hin, insbesondere was die Keuchhustenprophylaxe anbetrifft.

Zwei Monate nach der ersten Wiederimpfung, die 6 Monate nach der ursprünglichen Schutzimpfung vorgenommen wurde, erreichten die Mittelwerte der Titer 7,5 I.A.E./ml, beim Diphterieantitoxin 6,2 I.A.E./ml beim Tetanusantitoxin und 1/790 beim Pertussisagglutinin. Auf Grund dieser Ergebnisse, stellt dass « Dr. I. Cantacuzino »-Institut gegenwärtig die D.T.P.-Trivakzine her, die vom sanitären-antiepidemischen Netz zur obligatorischen Schutzimpfung der Kinder im Alter von 4—6 Monaten verwendet wird.

Wir beabsichtigen diese Kinder weiter zu verfolgen, um die Dynamik der Antikörper nach der zweiten und dritten Wiederimpfung zu erfassen und gleichzeitig die für die epidemiologische Probe notwendigen Angaben zu sammeln.

ASSOCIATED DIPHTHERIA-TETANUS-PERTUSSIS VACCINE

Note II. POSTVACCINAL REACTIONS AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN VACCINATED CHILDREN

SUMMARY

Schick tests were performed in a group of 1072 children from rural districts, aged 4—18 months, who had not been vaccinated against diphtheria, tetanus and hooping cough, and 396 Schick positive children (36.09 per cent) were selected.

The whole group of children (Schick-positive and Schick-negative) were vaccinated by the intramuscular route with 0.5 ml D.T.P. trivaccine prepared according to the formula indicated in the paper.

Postvaccinal local and constitutional reactions were quite moderate as regards both their incidence rate and their intensity.

Five weeks following the third trivaccine inoculation, in all the children who had initially been Schick-positive the test was found to have become negative.

The D.T.P. trivaccine tested possesses a high immunogenic potency which may be estimated by the maximal values, geometric means, and minimal values of the diphtheria antitoxin, tetanus antitoxin, and *B. pertussis* agglutinin at the end of five weeks following vaccination.

Six months after vaccination, the mean diphtheria antitoxin titre persisted at the same level, the mean tetanus antitoxin titre had decreased but was still considerably above limiting figures, i.e. sufficient for protection, whereas the mean *B. pertussis* agglutinin titre has greatly decreased.

These results show once more that booster inoculations are required, particularly as regards the prophylaxis of hooping cough.

Two months after the first booster inoculation administered 6 months following vaccination, the mean titres were: 7.5 I.A.U./ml for diphteria antitoxin, 6.5 I.A.U./ml. for tetanus antitoxin, and 1/790 for *B. pertussis* agglutinins.

On the basis of these results, the D.T.P. trivaccine applied by the antiepidemic sanitary network in the compulsory vaccination of children from 4—6 months of age is now being prepared in the « Dr. I. Cantacuzino » Institute.

We propose further to follow up these children by investigating the antibody dynamics in relation to the second and third booster injections and at the same time to collect the data required for the epidemiological test.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES SUR L'INTOXICATION À L'OXYCYANURE DE MERCURE

par

C. Bonciu et Monica Petrovici

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service d'Anatomie Pathologique)

— Manuscrit reçu le 22 novembre 1959 —

L'effet de l'oxycyanure et du cyanure de mercure, substances toxiques par excellence pour l'organisme humain, a été peu étudié du point de vue expérimental. L'action de ces substances est complexe à cause de l'intervention des facteurs CN et Hg- également toxiques.

En ce qui concerne le cyanure de mercure on trouve dans la littérature de nombreux cas d'intoxications par voie orale et intraveineuse chez l'homme (Rousset, Monzes, Lakay, Nanta, etc.), d'intoxications expérimentales chez les lapins (par voie intraveineuse 2—2.5 mg/kg animal -- dose mortelle) et l'étude des lésions déterminées (Pasteur Vallery-Radot (15), Hunter (8), Moore (13), etc.) et enfin des études sur la dissociation rapide du toxique dans un milieu légèrement acide ou en présence de substances albumineuses (lait, sang), avec élimination importante de CN (Fabre et Josset, cités par Stary (16)).

En ce qui concerne l'oxycyanure de mercure, moins toxique que le cyanure, on trouve dans la littérature des cas d'intoxications par voie orale (Lewsky (11), Stary (16), Hagi-Paraschiv (6), Berner, Mayer, Andrade (1), Labro-Onell, etc.) ou par voie vaginale (Iacobi, Diaz-Bravo, etc.).

A notre connaissance, la littérature ne possède pas de données expérimentales sur l'action toxique de l'oxycyanure de mercure, ce qui nous a déterminé à entreprendre des recherches expérimentales sur cobayes, concernant:

A. La détermination de la dose minimum mortelle, par différentes voies;

B. L'action du sang, en milieu légèrement acide, sur la toxicité;

C. Lésions provoquées par l'oxycyanure de mercure.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été effectuées sur 95 cobayes, de 400 à 650 g, avec une solution d'oxycyanure de mercure (Oxycyanure de mercure (Ct. de cyanure) D.A.B. 6 Merck) en différentes dilutions (eau distillée).

La solution a été administrée par introduction directe dans l'œsophage à l'aide d'une aiguille de seringue spéciale (recourbée et protégée au bout par

une boule métallique) et par inoculations intraveineuses, intrapéritonéales, souscutanées et intracraniennes (sousdural).

Dans le but d'établir l'action du sang en milieu légèrement acide sur la toxicité de l'oxycyanure de mercure, on a introduit par les mêmes voies (sauf intracranienne) du sang défibriné de mouton et la solution de cyanure, mélangé et séparément.

Les animaux ayant résisté à l'administration du toxique, ont été sacrifiés après 10 à 18 jours.

RÉSULTATS

A. *Détermination de la dose minimum mortelle*, établie en fonction de la durée de survie des animaux (moyenne) après l'administration du toxique.

1. *Per os* — dose minimum mortelle: environ 0,01 g/kg animal (solution 1%: 0,03 g — mort immédiate, 0,02 g — en 24 heures, 0,01 g — en 2 jours, 0,005 g — en 5 jours; solution 1/500: 0,0025 et 0,001 g — survie (sacrifiés).

2. *Inoculation intraveineuse* — dose minimum mortelle: environ 0,002 g/kg animal (solution 1%: 0,01 et 0,005 g — mort immédiate, 0,0025 g — en 3 jours, 0,001 — en 7 jours; sol. 1/500: 0,0005 et 0,00025 g — survie (sacrifiés)).

3. *Inoculation intrapéritonéale* — dose minimum mortelle: environ 0,0066 g/kg animal (sol. 1%: 0,01 — mort en une demi-heure: 0,005 g — en 24 heures; 0,0033 g — en 2 jours: sol. 1/500: 0,002 et 0,001 g — survie (sacrifiés)).

4. *Inoculation souscutanée* — dose minimum mortelle: environ 0,0066 g/kg animal (sol. 1%: 0,02 — mort en 10 heures, 0,01 g — en 24 heures, 0,005 g — en 3 jours, 0,0033 g — en 5 jours; sol. 1/500 — survie (sacrifiés)).

5. *Inoculation intracranienne* — dose minimum mortelle: environ 0,0001 g/kg animal (sol. 1/500: 0,0006 et 0,0004 g — mort immédiate: sol. 1%: 0,0002 g — mort immédiate; sol. 1/5000: 0,00005 g mort en 24 heures; sol. 1/10.000: 0,0003 et sol. 1/20.000: 0,000015 g — survie (sacrifiés)).

A remarquer que les mêmes quantités (0,2—0,5 ml) d'eau distillée ou de sérum physiologique, inoculées par voie intracranienne n'ont pas provoqué la mort des animaux.

B. *Action du sang, sur la toxicité en milieu légèrement acide produit par l'autolyse du sang injecté*, établie en fonction de la durée de survie des animaux (moyenne) après administration du toxique + sang défibriné de mouton.

1. *Per os:*

a) sol. mélangée avec 1 ml sang: 0,005 g — mort en 3 heures, 0,0025 g — en 3 jours. 0,001 g — en 7 jours et 0,0005 g — en 13 jours;
b) sol. mélangée avce 3 ml sang: mêmes doses, mort en 2, 5, 13 et 15 jours;
c) 0,0025 g toxique per os et 1 ml sang souscutané: mort en 4—5 jours;
d) témoins, ayant reçu 3 ml sang per os — survie.

En résumé: l'administration per os d'un mélange de toxique avec 1 ml sang entraîne rapidement la mort des animaux, même avec des doses non-mortelles (0,001 et 0,0005 g); par l'augmentation de la quantité de sang (3 ml) l'action est légerement réduite. La même action du sang (1 ml) se remarque même s'il est inoculé séparément (souscutané), la mort des animaux survenant même après des doses non-toxiques (0,0025 g).

2. *Inoculation intraveineuse:*

a) sol. mélangée avec 1 ml sang: 0,001 g et 0,0005 g — survie;
b) solution + 3 ml sang, mêmes doses (mélange) — survie;
c) 0,0005 g intraveineux et 1 ml sang souscutané — mort en 5—7 jours;
d) témoins, ayant reçu 3 ml sang (voie intraveineuse) — survie.

En résumé: l'administration intraveineuse d'un mélange de sang (1 ou 3 ml) et de substance toxique, prouve que le sang n'a pas d'action sur le toxique. L'inoculation séparée (sous-cutanée) du sang (1 ml) provoque la mort des animaux, même en présence de doses non-mortelles de substance toxique (0,0005) g).

3. *Inoculation intrapéritonéale:*

a) sol. mélangée 0,001 g avec 1 ml sang—mort en 2—12 jours; solution 0,001 g mélangée à 3 ml sang — mort en 6—14 jours;
b) solution 0,0005 g + 1 ml ou 3 ml sang — survie, les animaux sont sacrifiés;
c) solution 0,001 g et 1 ml sang souscutané — mort en 4—6 jours;
d) témoins inoculés avec 3 ml sang — survie.

En résumé: l'administration intrapéritonéale de la substance toxique mélangée avec 1 ml sang, peut produire la mort des animaux même en doses non-mortelles (0,001 g); si la quantité de sang est augmentée (3 ml) son action est plus réduite. La même action du sang est mise en évidence par l'injection du sang par voie souscutanée (séparément), même en présence de doses toxiques non-mortelles (0,001 g).

4. *Inoculation sous-cutanée:*

a) mélange de 0,001 g + 1 ml sang: mort en 6—12 jours; même dose + 3 ml sang — mort à 10—14 jours;
b) mélange de 0,0005 g + 1 ml sang: mort en 10—12 jours, même dose + 3 ml sang— mort en 14—16 jours;
c) sol. 0,001 g et 1 ml sang (voie souscutanée)—mort en 8—15 jours;
d) témoins inoculés avec 3 ml sang (voie souscutanée)—survie

En résumé: l'administration souscutanée de la substance toxique mélangée avec du sang (1 ml) provoque la mort des animaux même en doses sous-létales (0,001 et 0,0005g); en augmentant la quantité de sang (3 ml), l'action du sang est plus réduite. La même action du sang (1 ml) est mise en évidence par l'injection de la substance toxique et du sang faite séparément, les animaux succombant même apres l'administration de doses sous-létales (0,001 g).

C. *Anatomie pathologique*

Afin de ne pas répéter la description des lésions observées chez les cobayes à la suite de l'administration de l'oxycyanure de mercure, par diverses voies, nous exposons d'abord les lésions produites par l'introduction du toxique « per os » ensuite, par les autres voies d'administration et puis les données supplémentaires propres à chaque voie d'introduction du toxique.

Les lésions observées seront décrites en 4 chapitres:

I. Lésions des les animaux morts immédiatement ou maximum dans l'intervalle d'une demi-heure après l'administration du toxique (lésions dégénératives du système nerveux central).

II. Lésions des animaux succombés après 3 à 48 heures (lésions dégénératives du système nerveux central, lésions dégénératives rénales et ulcératives intestinales).

III. Lésions chez les animaux morts après 3 jours et plus (absence des lésions dégénératives du système nerveux central).

IV. Lésions chez les cobayes sacrifiés.

A. I. *Per os*: mort immédiate ou dans l'intervalle d'une demi-heure

I. *Moelle et bulbe :* congestion, oedème et légères hémorragies périvasculaires, lésions dégénératives des cellules motrices (cellules tuméfiées, avec marges estompées, les granulations de Nissl conglomérées ou pulverulentes, parfois ombres nucléaires ou noyaux disparus et ombres cellulaires).

Cerveau, cervelet : mêmes lésions congestivo-hémorragiques, œdème et parfois des cellules nerveuses polyvalentes (en particulier celles des noyaux centraux), avec les mêmes lésions dégénératives, mais moins prononcées.

Pia mater et plexus choroïdes : congestion, œdème et légères hémorragies.

Reins : forte congestion avec légères hémorragies, œdème de la médullaire.

Estomac, intestin grêle, côlon : congestion, œdème de toute la paroi et congestion, œdème des mesos.

Poumon : forte congestion, œdème, hémorragies (fortes ou légères), parfois réaction catarrhale alvéolaire.

Coeur : congestion, zones d'œdème interfibrillaire et fibrillaire.

Foie : congestion prononcée et légères hémorragies.

Surrénales : congestion prononcée et parfois de légères hémorragies, surtout dans la médullaire.

Les autres organes présentent une congestion plus ou moins importante.

En résumé: chez les cobayes, ayant reçu « per os » de l'oxycyanure de mercure, succombés immédiatement ou maximum dans le délai d'une demi-heure après l'administration, on a observé: des lésions congestivo-hémorragiques dans tous les organes, oedème du système nerveux central et lésions dégénératives de la cellule nerveuse, particulièrement des cellules motrices.

II. Per os: mort en 3 à 48 heures

Système nerveux central : dans la majorité des cas (60%), on a trouvé les mêmes lésions que celles décrites, avec en plus, dans certains cas, une légère réaction gliale.

Reins : mêmes lésions + lésions dégénératives de l'épithélium rénal (en particulier les tubes contournés, et la portion intermédiaire), arrivant parfois jusqu'à la nécrose.

Foie : mêmes lésions + zones avec cellules hépatiques présentant une intumescence aiguë.

Rate : congestion et légères hémorragies disséminées.

Coeur : mêmes lésions + zones d'œdème, légère infiltration avec mono et polynucléaires.

Côlon : Lésions congestivo-hémorragiques et parfois des ulcérations de la muqueuse.

Surrénales : médullaire — forte congestion et légères hémorragies, les cellules médullaires ont un aspect alvéolaire; *corticale* — congestion dans la zone trabéculaire, certaines cellules présentant une intumescence aiguë, d'autres avec coloration intense du protoplasma et les noyaux en pycnose.

Les autres organes présentent, en général, le même aspect que celui décrit plus haut; dans certains cas on a trouvé dans la cavité abdominale un liquide sanguignolent.

En résumé: Les animaux, ayant reçu de l'oxycyanure de mercure « per os » et succombés 3 à 48 heures après l'administration du toxique, ont présenté en plus des lésions décrites chez le premier groupe: apparition de lésions dégénératives dans les reins (en particulier), le foie et les surrénales et parfois un exsudat sanguignolent dans la cavité abdominale, ainsi que des lésions congestives hémorragiques et exulcératives sur le colon.

III. Per os: morts après 3 jours et plus après l'administration du toxique.

Système nerveux central: on remarque l'absence de lésions dégénératives des cellules nerveuses, qui ne se trouvent qu'exceptionnellement (1,5%). Les autres lésions sont celles décrites aux points I et II, comme suit:

Reins : congestion, œdème, légères hémorragies. Les glomérules agrandies, dans certains cas l'épithélium de la capsule de Bowman tuméfié et exsudat albumineux intracapsulaire. Lésions dégénératives pronnoncées allant jusqu'à la nécrose totale de l'épithélium rénal (tubes contournés et portion intermédiaire) avec dépôt de sels de calcium dans le protoplasma ou dans le lumen des tubes (granules de dimensions variées). Cylindres hyalins, colloïdes, granulaires et parfois leucocytaires. Parfois des lésions infiltratives (mono et polynucléaires) et même réaction fibroblastique et dilatation kystique des tubes rénaux.

Côlon : congestion prononcée, œdème de la paroi entière, en particulier dans la muqueuse et sous-muqueuse, hémorragies diffuses ou en foyers (grands et petits) dans toutes les couches. Plaques de nécrose de la muqueuse, exulcérations et ulcération allant jusqu'à la musculaire infiltration diffuse et en foyers avec mono et polynucléaires. Macrophages ferriques dans la muqueuse non-ulcérée. Dans certains cas on a observé dans la muqueuse des granules fins de calcium.

Intestin grêle : congestion, œdème prononcé, et parfois dans la zone terminale les mêmes lésions que celles du côlon.

Estomac : congestion et œdème prononcés.

Poumon : congestion, œdème et hémorragies. Foyers de pneumonie catarrhale, foyers pneumoniques avec cellules géantes multinucléées, foyers pneumoniques simples (nombreuses polynucléaires) et même abcès pulmonaires. Emphysème compensateur. La muqueuse trachéale et bronchiale congestionée, œdematiée avec beaucoup de mucus, bronchite aiguë.

Coeur: lésions congestivo-hémorragiques, oedème, lésions dégénératives de la fibre myocardiaque, en général légères, mais parfois des zones de dégénérescence cireuse (Zenker) et même déposition de calcaire sous forme de granules fins. Légère infiltration diffuse avec mono et polynucléaires.

Foie: congestion, infiltration avec histyocytes, mono et rares polynucléaires, dans l'espace de Kiernan et les espaces intertrabéculaires-hyperplasie du tissu réticulo-endothélial. Lésions dégénératives, relativement légères, de la cellule hépatique, et, dans certains cas, cellules hépatiques, avec le protoplasma intensément coloré et noyaux en pycnose. Infiltration grasse des cellules hépatiques (différents degrés) allant parfois jusqu'à une forte infiltration graisseuse.

Surrénales : médullaire — congestion, légère hémorragies, lésions dégénératives dans les cellules médullaires, infiltrations avec mono et polynucléaires à différents dégrés et présence d'inclusions protoplasmatiques dans le protoplasma de la cellule médullaire et dans les sinus; *corticale :* congestion, légères hémorragies, lésions dégénératives et infiltratives (mono et polynucléaires) dans les zones réticulaire et trabéculaire, très rarement de fins granules calcaires dans les cellules corticales.

Rate : congestion, sinus dilatés, hyperplasie réticulo-endothéliale dans la pulpe rouge et follicules, rarement des mégacaryocytes, nombreux macrophages ferriques et fréquents éosinophiles.

Hypophyse : congestion, rarement des lésions dégénératives de la cellule hypophysaire avec noyaux en pycnose, réduction du nombre des cellules éosinophiles et gouttes de colloide (éosinophile, ou basophile).

Glandes salivaires : congestion, œdème, hypersecrétion muqueuse ou albumineuse.

Thyroïde : congestion, œdème, les vésicules thyroïdiens agrandis avec colloïde éosinophile.

Pancréas : congestion et œdème interstitiel.

Testicule : congestion, œdème, parfois des lésions dégénératives de l'épithélium séminal (très rarement des cellules géantes multinucléées.)

Utérus : congestion, œdème de la muqueuse et rarement hémorragies de la muqueuse.

Trompes et ovaire : congestion et œdème.

Placente : congestion, hémoragies et prarfois lésions dégénératives, allant jusqu'à la nécrose.

Deciduom : Parfois des hémorragies et infiltration avec mono et polynucléaires.

Embrion et foetus : Foie — congestion, légères hémorragies, parfois des lésions dégénératives de la cellule hépatique (cellules intensément colorées et noyaux en pycnose); *poumon*, légères hémorragies.

En résumé: Chez les animaux succombés 3 jours et plus après l'administration de la substance toxique on remarque l'absence des lésions dégénératives de la cellule nerveuse, la présence des lésions de glomérulo-néphrose nécrotique avec dépôts de calcaire, colite ulcérativo-hémorragique avec dépôts de calcaire, hépatite avec lésions dégénératives et infiltration graisseuse, myocardite et lésions dégénératives avec dépôts de calcaire, surrénalite avec lésions dégénératives (parfois avec dépôt de calcaire), inclusions protoplasmatiques dans la médullaire, pigment ferrique en grandes quantités dans la pulpe rouge splénique, etc.

L'influence du toxique se manifeste chez l'embrion ou le foetus, par la présence de lésions hémorragiques et dégénératives dans le foie et hémorragiques dans le poumon.

IV. *Animaux sacrifiés*: absence de lésions du système nerveux central; lésions rénales dans 40% des cas et rarement (6%) des lésions au niveau du côlon.

b. *Inoculation souscutanée*

Région de l'inoculation: congestion, oedème, hémorragies, exsudat albumineux et fibrino-leucocytaire, lésions de la fibre musculaire striée allant jusqu'à la nécrose, fibres musculaires multinucléées (avec dépôt de calcaire), tissu de granulation, sclérose, etc.

En général, les lésions sont les mêmes que celles observées après l'administration « per os », avec les suivantes remarques: lésions dégénératives hépatiques plus prononcées, allant jusqu'à la nécrose, lésions dégénératives dans les surrénales, hypophyse, myocarde, testicule et lésions congestivo-hémorragiques plus prononcées. Liquide hémorragique dans les cavités abdominales et thoraciques.

c. *Inoculation intraveineuse*

En général, les lésions congestivo-hémorragiques et dégénératives- nécrotiques hépatiques avec, parfois, déposition de calcaire, sont encore plus prononcées, de même dans le myocarde — et même présence des lésions dégénératives dans les cellules pancréatiques.

d. *Inoculation intrapéritonéale*

En général, les mêmes lésions que celles observées à l'administration « per os », en mentionnant: lésions rénales plus précoces et plus graves, avec forte déposition de calcaire (dans les glomérules et les tubes), la séreuse pariétale et splachnique avec oedème très prononcé et tuméfaction de l'épithélium; dans les mesos et épiploon — forte congestion, oedème, infiltration diffuse et nodulaire (mono et polynucléaires) et exsudat fibrineux; fortes hémorragies et zones nécrotiques dans la rate avec hyperplasie réticulo-endothéliale intrafolliculaires, lésions hémorragico-nécrotiques et infiltration grasse prononcée du foie. Lésions hémorragiques et dégénératives plus fréquentes dans la médullaire surrénale, avec lésions et dépôt de calcaire dans la corticale. Lésions d'adénite aiguë avec hyperplasie réticulo-endothéliale dans les ganglions pancréatiques.

e. *Inoculation intracranienne*

En général, les mêmes aspects que ceux observés après l'inoculation intraveneuse, mais avec des doses réduites de substances toxiques, avec prédominance des lésions congestivo-hémorragiques au niveau du système nerveux central, de la pia mater et des plexus choroïdiens, lésions dégénératives de la cellule nerveuse, en particulier des noyaux centraux accompagnées, dans certains cas, par une réaction gliale et lésions infiltratives dans l'écorce cérébrale, la piamater et les plexus choroïdes.

★

Nos recherches concernant la toxicité de l'oxycyanure de mercure efectueés sur les cobayes ont montré que les doses minima mortelles sont (approximativement): per os — 0,01 g; voie intraveineuse — 0,002 g; voie intrapéritonéale — 0,0066 g; voie souscutanée — 0,0066 g et voie intracranienne — 0,0001 g per kg. animal. Par conséquent, la voie la plus sensible est celle intracranienne, suivie par les voies: intraveineuse, souscutanée, intrapéritonéale et pour finir la voie orale.

On sait que la dose mortelle de cyanure de mercure (voie intraveineuse) est de 0,002—0,0025 g/kg corps animal (lapin), dose se rapprochant de celle d'oxycyanure pour les cobayes. Etant donné que l'oxycyanure est moins toxique que le cyanure de mercure, on peut déduire que le lapin est moins sensible que le cobaye à l'oxycyanure de mercure, administré par voie intraveineuse.

Il a déjà été démontré que la molécule d'oxycyanure de mercure contient moins de CN que le cyanure, ce qui explique la toxicité plus faible de l'oxycyanure de mercure. D'autre part, la quantité de mercure que renferme l'oxycyanure de mercure (85, 4%) est supérieure à celle qui se trouve dans le cyanure (79,3%) et supérieure à la quantité de Hg du chlorure mercurique (73,9%). Le taux réduit de mercure et l'absence de CN explique la faible toxicité du chlorure mercurique par rapport à celle de l'oxycyanure et du cyanure de mercure. A noter que chez l'homme les doses toxiques mortelles sont: 0,20—0,50 g pour le chlorure mercurique, 0,10 g pour le cyanure de mercure et un peu plus de 0,10 g. pour l'oxycyanure de mercure. Ces données ont été confirmées aussi par nos recherches effectuées avec le chlorure mercurique sur le cobaye. Les résultats obtenus sont les suivants: les doses minima mortelles de chlorure mercurique sont de 2 à 3 fois plus grandes que celles d'oxycyanure de mercure (souscutanées: 0,02 g; per os — 0,02 g; intraveineuses — 0,004 g/kg corps animal).

Toutes ces données prouvent clairement que le cyanure et l'oxycyanure de mercure sont plus toxiques (par la présence du CN) que le chlorure mercurique, bien que la quantité de mercure de la dose mortelle pour l'homme de chlorure mercurique soit plus grande (158,6—396,5) que celle de l'oxycyanure ou du cyanure de mercure (85,4 et 79,3).

Le CN en doses faibles est un stimulent des centres nerveux respiratoires et cardiaques, les doses plus grandes (HCN en dilution 1/50.000 Müntzen *in vitro* et 0,005 g chez l'homme) ont une action paralysante sur la fonction oxydante des cellules (sur les ferments oxydants), en suspendant les échanges gazeux des cellules (la cellule ne reçoit plus l'oxygène et retient CO_2), ainsi que le prouve la couleur rouge du sang veineux des intoxications avec cyanure de mercure. De toutes les cellules de l'organisme, les cellules nerveuses (et spécialement

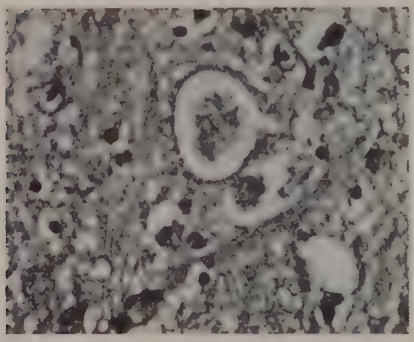


Fig. 1. — Moelle osseuse: cellule motrice complètement détruite (ombre). Cobaye mort 5 à 10 minutes après l'inoculation.

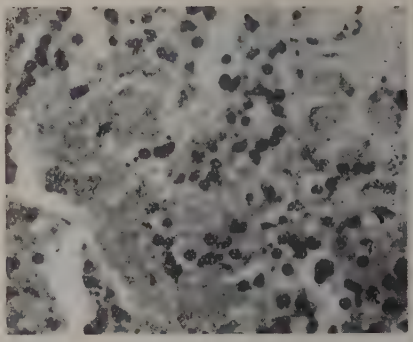


Fig. 2. — Hypophyse: lésions hémorragico-dégénératives. × 400

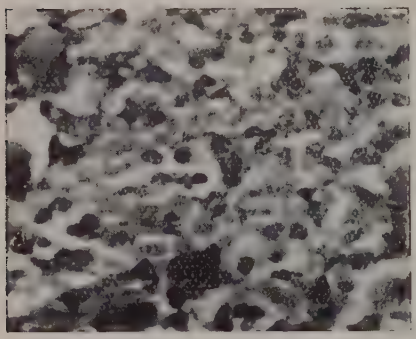


Fig. 3. — Hypophyse: grosses gouttes de colloïde. × 400

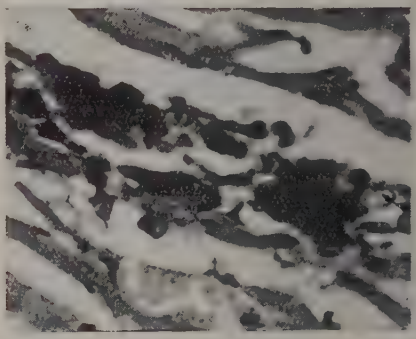


Fig. 4. — Coeur: lésions dégénératives avec dépôt de calcaire. × 400

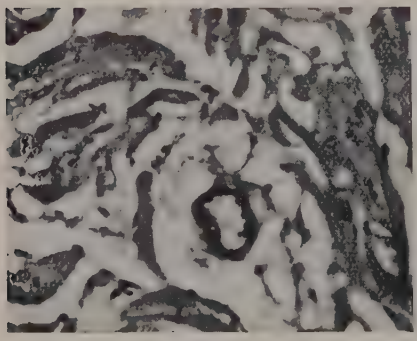


Fig. 5. — Coeur: œdème inter-fibrillaire massif. × 240

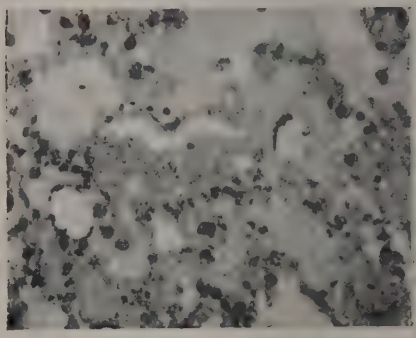


Fig. 6. — Poumon : foyers d'œdème et hémorragie. × 240

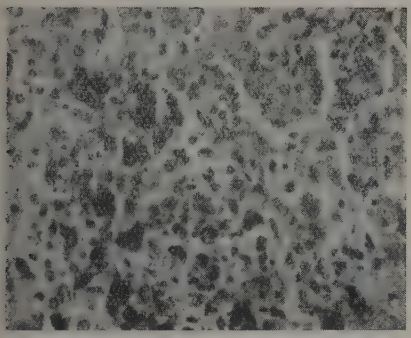


Fig. 7. — *Foie*: lésions dégénératives nécrotiques avec dépôt de calcaire. × 240.

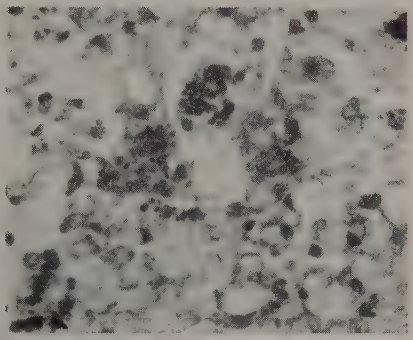


Fig. 8. — *Surrénale*: lésions dégénératives nécrotiques avec dépôt de granules fins de calcaire (corticale). × 400

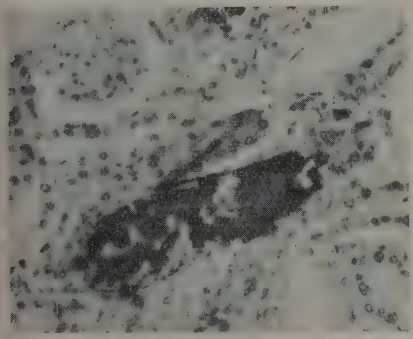


Fig. 9 — *Reins*: lésions dégénératives dans les tubes contournés avec dépôt calcaire. × 240

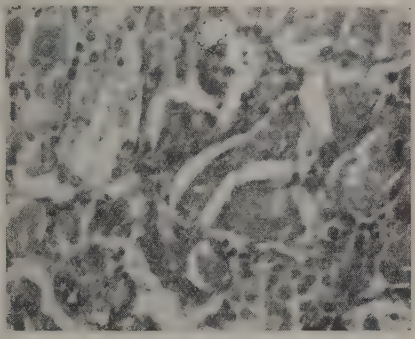


Fig. 10 — *Reins*: nécrose des tubes contournés × 240.

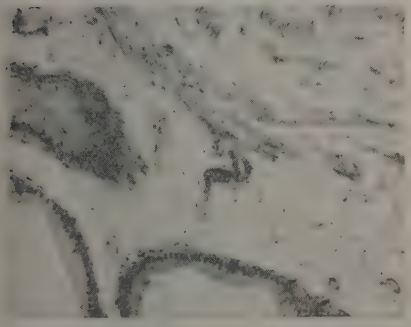


Fig. 11. — *Trompes*: œdème massif de la muqueuse et de la musculaire. × 120

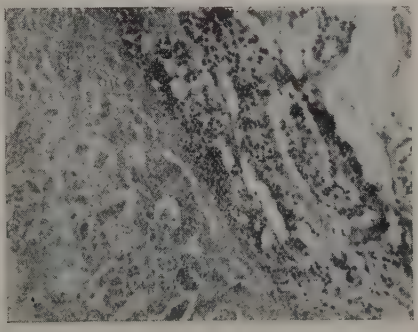


Fig. 12. — *Colon*: colite nécrotique. × 120

les cellules motrices) sont les plus sensibles à l'arrêt des échanges gazeux. Le CN est facilement diffusible dans l'organisme et la mort est d'habitude foudroyante ou rapide par paralysie des centres respiratoires ou cardiaques du bulbe, avec convulsions, perte de l'urine et des matières fécales, paralysies, parfois asphyxie et arrêt du coeur. Le CN est rapidement détruit dans l'organisme et si l'animal ou l'homme survit à la phase immédiate d'intoxication, la guérison est rapide, sans laisser de séquelles.

En ce qui concerne l'action toxique du mercure elle dépend de la solubilité, de la diffusion et la dissociation des sels, ayant une action générale et locale sur l'organisme.

Dans l'organisme, n'importe quel sel de mercure se transforme en chlorure mercurique, qui à son tour se combine à l'albumine, formant le chlor-albuminat de mercure toxique. Ce composant agit spécialement sur le système cardio-vasculaire (voie neurogène) provoquant des troubles de circulation (circulation ralentie, stase veineuse, trombus veineux, hémorragies, etc.) avec répercussion sur les tissus, affectant notamment les tissus nobles.

L'élimination du mercure se fait par le côlon et les reins, ce qui explique la présence des lésions importantes au niveau de ces organes (colite ulcéro-nécrotique et hémorragique, glomérulo-néphrose nécrotique).

Selon certains auteurs, le toxique exercerait aussi une action directe sur l'épithélium rénal. On observe, de même, des troubles dans le métabolisme du calcium, par retention d'eau dans l'organisme et modifications de la solubilité du calcium (dépôts calcaires dans les cellules lésées ou extracellulaire).

Le cyanure et l'oxycyanure de mercure sont peu solubles dans l'eau et leur dissociation dans l'organisme (en particulier celle de l'oxycyanure) se fait difficilement, si des conditions spéciales n'interviennent pas, notamment la présence d'un milieu légèrement acide (suc gastrique, secrétion vaginale acide), qui favorise de beaucoup la dissociation, permettant des effets toxiques puissants, pouvant provoquer une mort rapide (10). Ces données reçoivent d'ailleurs une confirmation expérimentale par nos recherches: lorsque le toxique est introduit simultanément avec le sang dans l'organisme, par l'acidose locale due à son autolyse, le sang hâte la dissociation du toxique et aggrave ses effets d'abord par la diffusion rapide du CN et ensuite par celle du mercure, en quantités relativement grandes.

Ainsi:

1. Par l'introduction de l'oxycyanure de mercure +1 ml sang « per os » l'action du toxique augmente 10 fois, par voie sous cutanée 6 fois et par voie intrapéritonéale 3 fois.

L'augmentation exceptionnelle de la toxicité de l'oxycyanure de mercure administré « per os » peut s'expliquer par le fait qu'à l'action du sang rapidement modifié par le suc gastrique s'ajoute l'action du suc gastrique et éventuellement, celle d'une hyperchlorhydie déterminée par le sang ingéré. L'action plus réduite du sang lorsque le mélange toxique-sang est introduit par voie intrapéritonéale (par rapport à celle sous-cutanée), pourrait s'expliquer par le fait que dans la cavité intrapéritonéale la réaction du sang se modifie plus difficilement que dans les tissus sous-cutanés.

La baisse de l'activité du mélange toxique (cyanure-sang) lorsque la quantité de sang est augmenté de 1 à 3 ml, serait attribuée au ralentissement de la diffusibilité du toxique exercé par l'excès de sang du mélange.

12. Même si l'inoculation du sang se fait dans une région différente de celle du toxique, mais simultanément, le sang continue à renforcer la toxicité de l'oxycyanure de mercure, mais en mesure toutefois plus réduite (2 fois plus réduite si le toxique est introduit „per os" ou par voie intraveineuse et 3 fois par voie intra péritonéale et sous-cutanée).

Ces faits pourraient s'expliquer par l'action du sang modifié lorsqu'il est inoculé par voie souscutanée (réaction légèrement acide) sur le toxique, qui étant véhiculé par le courant sanguin, parvient au niveau de l'inoculation.

En ce qui concerne les lésions histopathologiques, leur répartition en 4 groupes (voire chapitre respectif) facilite l'interprétation et explique en même temps le rôle du CN et Hg dans le mécanisme de la mort, de la manière suivante:

1. Les lésions observées dans les cas de mort rapide (immédiate ou jusqu'à 1/2 heure après l'introduction du toxique) sont les mêmes que celles provoquées par l'intoxication au CN: syndrôme congestivo-hémorragique avec lésions dégénératives des cellules nerveuses (en particulier des cellules motrices du bulbe et de la moelle).

2. Les lésions observées, lorsque la mort est survenue après 3 à 48 heures, sont les mêmes que celles décrites, auxquelles s'ajoutent des lésions dégénératives dans les organes, spécialement dans les reins et le côlon (lésions ulcératives et hémorragiques). Ces lésions sont propres aux intoxications avec des sels de mercure. En ce qui concerne les lésions dégénératives des cellules nerveuses, elles peuvent être dues aussi bien au CN qu'au mercure (par troubles circulatoires). Dans la mort survenue après 3 jours et plus, on ne constate plus de lésions de la cellule nerveuse, par contre les lésions dégénératives, infiltratives et hémorragiques occupent tout le tableau histopathologique, localisées surtout au niveau du rein (glomérulo-néphrose nécrotique avec déposition de calcaire), gros intestin (colite nécrotique ulcérative hémorragique) et dans les surrénales (surrénalite aiguë dégénérative avec apparition d'inclusions protoplasmiques dans la médulaire surrénale), ainsi que le dépôt de grandes quantités de pigment ferrique dans la rate, dus à la destruction des globules rouges. Toutes ces lésions sont provoquées par les sels de mercure. Aux lésions observées s'ajoutent diverses complications dans tous les organes et en particulier dans le poumon.

CONCLUSIONS

1. Les doses minima mortelles d'oxycyanure de mercure pour les cobayes sont les suivantes: « per os » 0,01 g, par voie souscutanée et intrapéritonéale 0,0066 g, par voie intraveineuse 0,002 g et par voie intracranienne 0,0001 g per kg/corps animal.

2. L'action toxique de l'oxycyanure de mercure est augmentée par son association avec le sang (sang défibriné de mouton), les doses minima mortelles diminuant: de 10 fois pour la voie orale, de 6 fois pour la voie souscutanée et de 3 fois pour la voie intrapéritonéale. L'introduction du toxique mélangé

au sang, par voie intraveineuse, n'augmente pas la toxicité de l'oxycyanure de mercure.

3. Par introduction séparée du sang (souscutanée) et du toxique, on observe l'augmentation de la toxicité de l'oxycyanure de mercure, mais dans une mesure plus réduite (la dose minima mortelle diminue de 2 fois après introduction du toxique per os ou par voie intraveineuse et de 3 fois par voie intrapéritonéale ou souscutanée).

4. Si la mort des animaux survient immédiatement ou dans l'intervalle d'une 1/2 heure après l'administration du toxique, l'examen histologique montre un syndrôme congestivo-hémorragique généralisé et des lésions dégénératives au niveau de la cellule nerveuse (en particulier des cellules motrices). Ces lésions correspondent aux lésions provoquées par le CN responsable de la mort du cobaye.

Aux lésions provoquées par le CN, en cas de mort après 3—48 heures, s'ajoutent des lésions dégénératives dans les organes, en particulier dans les reins et côlon, (lésions de colite ulcéro-hémorragique). Les deux dernières lésions typiques étant déterminées par le mercure. Par conséquent la mort est due à deux facteurs toxiques: le CN et le mercure.

L'examen histopathologique des animaux morts après 3 jours montre: syndrôme congestivo-hémorragique, lésions dégénératives dans les organes, en particulier au niveau des reins (glomérulo-néphrose nécrosante avec déposition de calcaire) et du côlon (colite ulcéro-hémorragique), surrénalite aiguë dégénérative (avec inclusions protoplasmiques dans les cellules de la médullaire), de grandes quantités de pigment ferrique dans la rate, hémosidérose), etc. Ces lésions sont caractéristiques pour les intoxications avec le mercure, qui dans ces cas, provoquent la mort de certains cas par complications (en particulier pulmonaires surajoutées).

Chez les animaux sacrifiés on a observé l'absence de lésions du système nerveux central; lésions rénales dans 40% des cas et rarement (6%) des lésions au niveau du côlon.

BIBLIOGRAPHIE

1. Andrade L. et Lamas D. — Deutsche med. Woch., 1936, **62**, 1498.
2. Bonciu C., Clecner Bia et Mărgineanu E. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **18**, 63.
3. Bonciu C., Demetresco R. et Petrovici Monica. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **19**, 111.
4. Fazeks J. F., Harriet Colver et Himwich H. E. — Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 1938, **42**, 497.
5. Glinka Chernomtskaia E. — Fiziol. Zhur, 1940, **29**, 460.
6. Hagi-paraschiv A. — Bull. et Mém. Soc. méd. d'Hôp. Bucarest, 1929, **11**, 253.
7. Henke F. et Lubarsch O. — Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie T 3/1 (Fahr, Th. Niere) 1925, Berlin Ed. Springer und T. 10 (Else Petri, Vergiftungen) 1930, Berlin.
8. Hunter W. C. et Roberts J. M. — Am J. Path., 1932, **8**, 665.
9. Ioanid N. — Toxicologie, 1931, Bucarest.
10. Lebeau P. et Courtois G. — Traité de Pharmacie chimique 1946, **3**, Paris.
11. Lewsky W. — Sammlung von Vergiftungsfälle Band 9 8/9 1938.
12. Muntwyler E. — Am. J. Physiol., 1934, **108**, 80.

13. Moore R. — Journal exp. Med., 1931, **53**, 303.
14. Ogier E. et Kohn Abrest E. — Chimie toxicologique 1924, Paris, Gaston Doin.
15. Pasteur Vallery-Radot-C.R.Soc. Biol. — 1933, **113**, 579.
16. Stary Z. — Sammlung von Vergiftungsfälle, 1937, **8**, 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТРАВЛЕНИЙ ОКСИЦИАНИСТОЙ РТУТЬЮ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные исследования токсического действия оксицианистой ртути привели к следующим выводам:

1) Минимальные смертельные дозы оксицианистой ртути для морских свинок следующие: перорально- 0,01 гр., подкожно и внутрибрюшинно 0,0066 гр, внутривенно 0,002 гр. и внутричерепным путем 0,0001 гр. на кг. живого веса.

2. Введение дефибринированной овечьей крови в смеси с оксицианистой ртутью усиляет токсическое действие последней, что ведет к снижению минимальных смертельных доз: перорально смертельная доза уменьшается в 10 раз; подкожно- в 6 раз и внутрибрюшинно в 3 раза. Внутривенно токсичность оксицианистой ртути не увеличивается.

3. При раздельном введении (подкожно) крови, усиление токсичности оксицианистой ртути происходит, но в меньшей степени (минимальная смертельная доза снижается в два раза, при пероральном, внутрибрюшинном или подкожном введении)

4. В случаях когда смерть морских свинок наступает тотчас-же или на протяжении пол часа, гистологическое исследование обнаруживает генерализированный полнокровно- геморрагический синдром и дегенеративные изменения нервных клеток, преимущественно моторных клеток. Данные поражения соответствуют поражениям, вызываемым группой CN и в данных случаях гибель животных зависит от них.

Если гибель животных наступает между 3—48 часами после отравления, к поражениям, причиненным CN, прибавляются дегенеративные поражения органов, преимущественно почек и язвенно-мембранозный колит. Эти последние поражения причиняются ртутью вследствие чего гибель обуславливается двумя токсическими факторами: CN и ртутью.

В случаях когда гибель животных наступает после 3 суток, гистопатологическое исследование обнаруживает: полнокровно-геморрагический синдром, дегенеративные поражения органов, преимущественно почек (некротизирующий гломеруло-нефроз с отложением извести) язвенно-геморрагический колит, острое дегенеративное воспаление надпочечников (с наличием плазматических включений в клетках мозговой зоны) большое количество железистого пигмента в селезенке, и.т.д. Такие поражения характерны для отравлений ртутью и обусловливают гибель в данных случаях (в некоторых случаях путем добавочных, преимущественно легочных осложнений).

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE VERGIFTUNG MIT QUECKSILBEROXYCYANID

ZUSAMMENFASSUNG

Aus experimentellen Untersuchungen, die über die toxische Wirkung des Quecksilberoxycyanids durchgeführt wurden, ergaben sich folgende Schlüssfolgerungen:

1. Die DLM für Meerschweinchen beträgt 0,01 gr *per os*, 0,0066 g subkutan oder intraperitoneal, 0,002 g intravenös und 0,0001 g endokranial (per Kilogramm Körpergewicht).

2. Durch die Verabreichung des Quecksilberoxycyanids in einer Mischung mit defibriniertem Schafblut wird die toxische Wirkung erhöht, so dass die DLM sich verringert, und zwar zehnmal *per os*, sechsmal subkutan und dreimal intraperitoneal. Bei intravenöser Einspritzung tritt diese Erhöhung der Toxizität des Quecksilberoxycyanids nicht auf.

3. Wird das Blut an einem anderen Ort eingeführt als das Gift (subkutan), so tritt die Erhöhung der Giftigkeit des Quecksilberoxycyanids gleichfalls ein aber in geringerem Ausmass (die DLM verringert sich zweimal bei Verabreichung *per os* oder auf intraperitonealem oder subkutanem Wege).

4. Tritt der Tod der Meerschweinchen sofort oder inerhalb einer halben Stunde ein, so ergibt die histologische Untersuchung ein Syndrom allgemeiner Hyperämie mit Blutungen und degenerative Schäden in den Nervenzellen, insbesondere in den motorischen Zellen. Dieses Bild entspricht den Schäden, die durch CN hervorgerufen werden und in diesem Falle ist letzteres für den Tod verantwortlich zu machen.

Tritt der Tod der Meerschweinchen zwischen der 3. und 48. Stunde ein, so gesellen sich den durch CN verursachten Schäden degenerative Läsionen in allen Organen, insbesondere in der Niere, und Schäden ulzerös-hämorrhagischer Colitis hinzu. Die letzteren werden durch Quecksilber verursacht, dass heisst der Tod wird in diesem Falle durch beide Gifte, CN und Quecksilber hervorgerufen.

Wenn schliesslich der Tod der Meerschweinchen nach 3 Tagen eintritt, so ergibt die histopathologische Untersuchung: ein Hyperämie und Blutungssyndrom, degenerative Schäden in den Organen, insbesondere in der Niere (nekrosierende Glomerulonephrose mit Kalkablagerung), ulzerös-hämorrhagische Colitis, akute degenerative Adrenalitis (mit Anwesenheit von Protoplasmaeinschlüssen in den Zellen des Markes), viel eisenhaltiges Pigment in der Milz u.s.w. Diese Schäden sind für die Quecksilbervergiftung charakteristisch, welche in diesen Fällen den Tod hervorruf (in einigen Fällen unter Hinzutreten von Komplikationen, insbesondere von solchen, die die Lunge betreffen).

EXPERIMENTAL INVESTIGATIONS CONCERNING MERCURY OXYCYANIDE POISONING

SUMMARY

Experimental investigations concerning the toxic action of mercury oxycyanide led to the following conclusions:

1. The minimal lethal doses of mercury oxycyanide in the guinea-pig are as follows: 0,01 g *per os*, 0.0066 g by the subcutaneous or intraperitoneal routes, 0.002 g by the intravenous route, and 0.0001 g by the intracranial route (per kg. body weight).

2. The toxic action of mercury oxycyanide is enhanced by its mixture with defibrinated sheep blood. The minimal lethal doses are 10 times lower per os, 6 times lower by the subcutaneous route, and 3 times lower by the intraperitoneal route. No enhancement of the toxicity of mercury oxycyanide in these conditions is recorded following intravenous administration.

3. If the blood and the toxic are inoculated separately by the subcutaneous route, the toxicity of mercury oxycyanide is again enhanced, but to a lesser extent (the minimum lethal dose is 2 times lower when the poison is introduced by the intraperitoneal or subcutaneous routes).

4. When death of the guinea-pigs occurs immediately or within $^1/_2$ hour, histological examination reveals the existence of a generalized congestive and haemorrhagic syndrome and of degenerative lesions at the level of the nerve cells, in particular of the motor cells. These lesions are equivalent to those induced by CN and in these cases death is due to the action of the latter.

If death of the guinea-pigs occurs from 3 to 48 hours following intoxication, degenerative lesions in the viscera, especially in the kindey, and lesions of ulcerous haemorrhagic colitis are added to those induced by CN. These lesions are due to the action of mercury, death being thus caused by both toxic factors, i.e. CN and mercury.

When death of the guinea-pigs occurs after 3 days, histopathological examination shows: a congestive haemorrhagic syndrome, degenerative lesions in the viscera, in particular at the level of the kidney (necrosing glomerulonephrosis with calcareous deposits) ulcero-haemorrhagic colitis, acute degenerative adrenalitis with the presence of inclusions in the cytoplasm of the cells in the medulla), large amounts of ferrous pigment in the spleen, etc. These lesions are characteristic of mercury poisoning which in these cases is the cause of death (in some instances with the addition of complications involving the lungs in particular).

INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LE DÉVELOPPEMENT ET LA TOXIGENÈSE DU *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*. ZONES OPTIMA DE TEMPÉRATURE DES CLOSTRIDIES

par

A. Săsărman et Thea Horodniceanu

avec la collaboration technique de Rodica Ciulley et Maria Kövary

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 15 mars 1961 —

Au cours des études concernant la mise au point d'une méthode d'isolement du *Cl. perfringens* par enrichissement préalable à 46° — 47° C (5,6),les auteurs ont observé l'effet stimulant de la température supérieure à 37° C sur le développement de ce germe. A ce sujet, Greer (3) a signalé, déja en 1928, qu'à la température de 50° C l'apparition du gaz dans les cultures de *Cl. perfringens* est plus rapide qu'à la température de 37° C; de même Boyd et coll. ont constaté qu'en cultivant la souche B.P_6.K. eu milieux synthétiques la croissance est plus rapide à la température de 43° — 46° C.

Les traités classiques (1,7) mentionnent que la température optimum pour le développement du *Cl. perfringens* est située dans la zone comprise entre 35°—37°C, enregistrant également sa croissance à 50° C. La température la plus favorable pour la toxigenèse se situerait approximativement dans la même zone, ou un peu plus en dessous (4).

En général, on fait une distinction entre la température optimum nécessaire à la croissance et celle exigée par la toxigenèse chez les germes qui élaborent une exotoxine, considérant que la température la plus favorable pour la toxigenèse est légèrement inférieure à celle nécessaire à leur développement.

Partant de ces faits, nous avons essayé de vérifier les données concernant la température optimum pour le développement et la toxigenèse du *Cl. perfringens* et les zones optima de température d'autres clostridies. Les résultats de cette étude font l'objet de la présente note.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'influence de la température sur le développement du *Cl. perfringens* a été appreciée du point de vue de son action sur le métabolisme général, exprimé par la rapidité de la croissance et la densité de la culture.

Les déterminations ont été effectuées sur 30 souches de *Cl. perfringens*, dont 25 de type A et par une souche de type B, C, D, E, et F. Une partie des

souches, respectivement: M, Lechien, Prague, B.P.$_6$ K, 12 SR, 1941, 6125 (type A), 1196 (type B), 1797 (type C), 366 (type D), 1241 (type E) et 2077 (type F), provenait de la collection de germes de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino », le reste des souches avait été fraîchement isolé.

Pour l'ensemencement on a utilisé des cultures de 24 heures en bouillon Vf, pH = 7,8, le volume de l'inoculum représentant 1% du volume du milieu.

La détermination de la température optimum pour le développement du *Cl. perfringens* a été faite en cultivant les souches respectives dans du bouillon Pope, pH = 7,8, glucosé 1%, contenant du thioglycollate de sodium 0,6‰, réparti par 80 ml dans des flacons de 100 ml. Avant l'ensemencement les milieux ont été régénérés par ébullition.

L'incubation des milieux de culture ensemencée a été faite à l'ultrathermostat simultanément aux températures suivantes: 36°, 37°, 38°, 39°, 40°, 41°, 42°, 43°, 44°, 45°, 46°, 47°, 48°, 49°C, à l'exception de 5 souches qui n'ont pas été soumises aux températures de 36° et 49°C. Pour chaque degré de température on a ensemencé trois flacons contenant le milieu de culture. Après régénération et refroidissement du milieu de culture, les flacons étaient maintenus pendant 30 minutes à l'ultrathermostat, aux températures nécessaires au développement; ensuite on a procédé à l'ensemencement. Les contrôles effectués ont montré que ce laps de temps est suffisant pour que le milieu atteigne la température désirée.

L'appréciation de la croissance a été faite par la détermination de la densité de la culture, à l'aide des standards d'opacité en verre de l'échelle de Brown.

Dans la plupart des cas, on a effectué deux déterminations néphélométriques: la première au moment où le degré de croissance le permettait pour la majorité des températures et la seconde après intervalle d'une heure. Finalement, on a fait la moyenne des résultats obtenus des trois échantillons ensemencés pour chaque degré de température. Pour les températures de 37°, 43°, et 46°C on a effectué deux déterminations néphélométriques supplémentaires (à 12 et 24 heures).

Par la suite, nous avons essayé de vérifier l'influence exercée par la température sur la toxigenèse du *Cl. perfringens* type A, utilisant dans ce but la souche B.P.$_6$ K, qui est employée dans l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » à la production de la toxine perfringens type A.

La souche a été cultivée en milieu Pope, pH = 7,8, glucosé, 1% avec viande rôtie, réparti par 80 ml dans des flacons de 100 ml capacité. Le milieu a été régénéré par ébullition; l'incubation a été faite à l'ultrathermostat simultanément aux températures de 34°, 36°, 38°, 40°, 42°, 44°, 46° et 48°C.

Pour chaque degré de température on a ensemencé trois flacons. Après régénération et refroidissement du milieu, les flacons étaient maintenus, avant l'ensemencement, pendant 30 minutes à l'ultrathermostat, aux températures respectives.

La toxigenèse a été poursuivie toutes les deux heures par la détermination de la dose minimum lécithinasique et de la capacité de combinaison lécithinasique, à partir de la 5-e heure jusqu'à 15 heures. La détermination de la dose minimum lécithinasique a été effectuée d'après la méthode courante. La détermination de la capacité de combinaison lécithinasique a été faite comme suit: aux dilutions de toxine perfringens en volume de 0,5 ml on a ajouté des volu-

mes égaux de sérum anti-perfringens type A en concentrations de 0,2 U.A/ml. Le mélange a été maintenu pendant 30 minutes à l'étuve, à 37°C, additionant ensuite par 0,2 ml. émulsion de jaune d'oeuf. Lecture des résultats après une nouvelle incubation d'une heure à l'étuve. La capacité de combinaison lécithinasique a été considérée comme la moitié de la dernière dilution encore positive (ex.: dernière dilution positive 1/10, capacité de combinaison 1/20).

Étant donné que les résultats de nos expériences ont montré que les températures supérieures à 37°C inhibent la toxigenèse du *Cl. perfringens* et que dans deux notes antérieures nous avons recommandé l'emploi de l'enrichissement à 46° — 47°C pour l'isolement de ces germes, nous nous sommes proposé de vérifier si en cultivant le *Cl. perfringens* à la température donnée, la capacité toxigène des souches respectives n'est pas affectée. Dans ce but, six souches de collection (B.P_6K, 6125, 12 SR, 1941, Prague, Lechien) ont subi des passages à intervalle de 24 heures pendant dix jours sur bouillon Vf., pH=7,8, incubé à 46° — 47°C. Les passages effectués de la même manière, mais après incubation à 37°C ont servi comme témoins. A la suite de ces passages, on a déterminé la capacité toxigène des souches par rapport aux témoins. La détermination a été faite en cultivant les souches en bouillon Pope, pH=7,8 glucosé 1%, avec viande rôtie, régénéré par ébullition. De chaque souche, ainsi que du témoin respectif, on a ensemencé trois flacons contenant le même milieu. Les cultures ont été centrifugées aprés 14 heures; ensuite on a déterminé la DML sur souris ainsi que la dose minimum lécithinasique du surnageant.

Etant donné que, contrairement aux données classiques, la température optimum pour le développement du *Cl. perfringens* a oscillé, dans nos expériences, autour de la zone de 43° — 44°C, nous avons cherché à établir si ce caractère est spécifique pour le *Cl.perfringens* ou bien s'il existe encore d'autres clostridies, qui se développent mieux à une température supérieure à 37°C. Dans ce but, nous avons poursuivi le comportement à la température de 43° — 44°C par rapport à 37°C de 31 souches de *Clostridium*, appartenant aux espèces suivantes: *Cl. septicum*, (4 souches), *Cl. oedematiens* (5 souches), *Cl. histolyticum* (4 souches), *Cl. sporogenes*, *Cl. chauvoei*, *Cl. tetanomorphum*, *Cl. sordelli*, *Cl. bifermentans*, *Cl. cochlearium*, *Cl. fallax* et *Cl. tertium* (par une souche) et *Cl. tetani* (10 souches). On a étudié de même l'influence de la température de 46°—47°C, fixée à pour la méthode d'enrichissement (préconisée par nous pour l'isolement du *Cl. perfringens*) sur le développement des autres espèces clostridiennes.

Les souches clostridiennes étudiées ont été cultivées selon la méthode décrite plus haut concernant la détermination de la température optimum pour le développement du *Cl. perfringens*. La détermination de la densité de la culture a été effectuée, dans la plupart des cas à deux reprises, à des intervalles variables, choisis en fonction du développement de la souche respective.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de la détermination effectuée concernant l'influence de la température sur le développement des 30 souches de *Cl. perfringens* sont résumés dans le tableau I, qui ne comprend pas les résultats des déterminations faites à 12 et 24 heures, effectuées seulement pour les échantillons incubés à 37°, 43° et 45°C.

L'analyse des données exposées dans le tableau I montre l'existence d'une zone optimum de développement, variant en fonction de la souche, entre 42° et 45°C. Dans la majorité des cas, cette zone se situe entre 43° — 44°C. Aussi, le développement obtenu à 37°C n'arrive pas à dépasser celui observé à 43°—44°C pas même après 12 ou 24 heures d'incubation.

Ainsi, on peut considérer comme établi que le développement optimum du *Cl. perfringens* à lieu à la température de 43°— 44°C et non à 35° — 37°C (1,7).

Il résulte, du même tableau, que le développement du *Cl. perfringens* à 46° — 47°C se rapproche, dans la majorité des cas, de celui obtenu à 37°C avec une légère inhibition dans certains cas. Ce fait est important pour la méthode d'enrichissement à 46° — 47°C préconisée par nous (5,6). On observe également qu'aux températures de 48° — 49°C le développement de la plupart des souches est inhibé par rapport à celui obtenu à 37°C.

L'étude de l'influence de la température sur la toxigenèse a permis, dans le cas de la souche B.P.$_6$K., de confirmer les données classiques, les meilleurs résultats étant obtenus à 34° — 36°C. A cette occasion, on a constaté la supériorité de la méthode de détermination de la capacité de combinaison lécithinasique, par rapport à la détermination de la dose minimum lécithinasique, pour l'appréciation qualitative des toxines.

Les résultats obtenus indiquent un grand décalage entre la température optimum exigée par la toxigenèse et celle nécessaire à la croissance, qui dépasse de beaucoup le décalage existant chez les autres germes toxigènes.

La culture de 6 souches incubées à 46° — 47°C, par passages à intervalles de 24 heures pendant 10 jours, n'a pas affecté leur capacité toxigène, par rapport à la culture effectuée à 37°C. Ce fait est également important pour la méthode d'enrichissement à 46—47°C, vu qu'il faut éviter les méthodes qui modifient les propriétés des souches, pouvant mener à de fausses conclusions. Ainsi, on peut conclure que l'isolement du *Cl. perfringens* par la technique d'enrichissement à 46° — 47°C ne modifie pas la capacité toxigène des souches.

L'étude du développement des 31 souches appartenant à différentes espèces clostridiennes, incubées aux températures de 43° — 44°C et 46° — 47°C a démontré que d'autres espèces présentent également un optimum de développement situé à une température supérieure à 37°C. Ainsi, les *Cl. oedematiens*, *chauvoei*, *tetanomorphum*, *bifermentans*, *cochlearium*, *tertium* se développent mieux à 43° —44°C qu'à 37°, tandis que les *Cl. septicum*, *histolyticum*, *sordelli*, *fallax*, *tetani* présentent une situation inverse, allant selon l'espèce, jusqu'à l'absence totale de croissance à 43° — 44°C. Ceci confirme les données de GREER (3) qui a décrit l'existence de clostridies qui se développent à 50°C, dans certains cas l'apparition du gaz étant plus rapide à 50°C qu'à 37°C. Il résulte que, du point de vue température optimum de développement, les clostridies pathogènes peuvent être divisées au moins en deux groupes.

Les faits exposés permettent une conclusion importante du point de vue pratique, respectivement que l'enrichissement à 46° — 47°C pourrait s'appliquer également à l'isolement d'autres espèces, comme par exemple de *Cl. odedematiens*, bien entendu à la suite d'une étude adéquate.

Développement des souches de Cl. perfringens à différentes températures

Souche	Type	Température 36°C	37°C	38°C	39°C	40°C	41°C	42°C	43°C	44°C	45°C	46°C	47°C	48°C	49°C
Prague (collection)	A	<100	125	100	125	325	500	583	1000	**1000**	**1000**	1000	—	458	<100
		375	1000	1000	1000	3000	3000	**4000**	3000	3000	3000	3000	—	2000	375
Lechien (collec.)	A	375	833	416	666	916	1000	1000	1330	**1500**	**1500**	1000	—	<100	<100
		1000	2660	2000	2000	4000	4000	6000	**5000**	**6000**	6000	3000	—	250	<100
12 SR (collec.)	A	375	300	366	416	750	1330	1500	1660	**2000**	1160	1000	417	100	175
		1500	1660	3000	3000	4000	6000	5330	**7660**	6660	4000	3330	2000	1000	333
N.C.T.C. 1941 (collec.)	A	250	241	250	375	916	1160	1160	**2000**	1330	1000	500	250	100	100
		1000	1660	1500	1830	3660	5000	5000	6000	**6330**	5000	3000	1660	750	150
BP_8K (collec.)	A	258	375	200	666	666	500	666	**1000**	273	213	<100	333	<100	<100
		666	1000	750	2000	3000	3000	3330	**4330**	1500	1125	273	833	<100	<100
M (collection)	A	750	500	375	1160	833	1000	**2000**	**2000**	1160	1250	250	1000	150	<100
		2000	3000	3000	3330	4000	4000	**6000**	**6000**	4660	4000	1500	1000	266	<100
6125 (collection)	A	<100	100	250	333	500	583	1330	1830	**2660**	2330	2000	2000	2000	170
		1000	916	1830	2000	3660	3000	4000	5000	**6000**	5000	3660	4330	4330	1330
2 (homme)	A	200	250	150	292	333	375	375	**750**	666	375	3335	416	200	<105
		833	1500	2000	2660	3000	2660	3000	**3000**	**3000**	3000	2660	1130	1160	475
4 (homme)	A	375	222	455	750	1000	1000	1500	1830	**2000**	**2000**	1500	1500	916	500
		2000	1000	2000	3000	4000	4000	5000	5660	**6000**	**6000**	5000	4660	2000	2000
28 (homme)	A	175	100	250	458	666	833	1000	**1160**	1000	458	175	<100	<100	<100
		916	1160	1830	2660	3330	4000	4660	**5660**	4660	3330	1500	500	100	<100
36 (homme)	A	250	150	250	375	458	750	1000	**1500**	**1500**	1160	833	375	250	<100
		500	1000	1160	2000	4000	4000	5000	**5000**	5000	4330	4000	2000	1330	333
45 (homme)	A	<100	<100	150	375	500	666	1160	1830	2660	**3000**	1660	2500	666	<100
		458	583	1000	1660	2330	3330	4660	**6000**	**6000**	5330	3660	916	3000	<100
47 (homme)	A	<100	100	200	375	583	750	1000	1330	**1500**	916	375	<100	<100	<100
		225	583	833	1130	2660	3660	4000	**4660**	**4660**	4000	2000	458	200	<100
61 (homme)	A	375	500	750	1000	1330	1660	**2000**	1830	1500	1160	750	375	250	100
		1500	3330	4000	4000	5000	6000	**6000**	**6000**	6000	4000	4000	3000	1660	666
65 (homme)	A	100	166	458	750	666	1130	**1330**	750	1130	666	100	<100	<100	<100
		200	833	3000	3000	3330	**4660**	**4660**	3330	3500	3000	895	100	<100	<100
72 (homme)	A	100	<100	100	150	250	500	918	**1500**	**1500**	1000	583	100	<100	<100
		583	500	666	1130	1830	3000	4000	**6000**	**6000**	5330	3330	1000	150	100
78 (homme)	A	133	<100	183	283	500	833	1160	1660	**2000**	1500	1160	333	100	100
		383	583	1000	1500	2330	3660	5330	**6000**	**6000**	5330	5000	916	292	100
86 (homme)	A	<100	100	100	175	225	458	666	**916**	750	500	250	<100	<100	100
		225	170	916	1500	2000	3000	3660	**4000**	**4000**	3000	2000	500	100	<100
88 (homme)	A	<100	100	225	200	500	583	1000	**1500**	1330	750	225	<100	<100	<100
		541	183	2000	2660	2330	2500	4000	**3500**	4000	3000	1830	200	<100	<100
90 (homme)	A	—	500	666	1000	2000	2000	2660	3660	**5000**	**5000**	4000	2660	750	—
95 (homme)	A	—	500	500	1000	2330	3660	4000	4330	**5000**	3000	1000	125	<100	—
96 (homme)	A	—	250	175	375	458	458	666	916	1160	**1500**	9916	583	100	—
		—	1660	1330	1830	2660	3660	4660	5330	**5660**	5000	4000	3330	666	—
99 (homme)	A	—	291	916	1000	1660	2330	**3000**	2660	1830	1330	<100	<100	<100	—
2 (cheval)	A	291	333	375	750	1000	1500	**1500**	**1500**	**1500**	750	375	250	225	100
		3000	3000	3000	3000	4000	4330	5660	**6000**	**6000**	5000	4000	1830	916	266
1 (porc)	A	200	125	225	250	333	583	750	833	**1000**	**1000**	500	375	190	<100
		1330	2000	2330	3000	3660	4000	4000	3660	**4330**	**4330**	4000	3000	1660	1500
N.C.T.C. 1196 (collec.)	B	100	150	250	500	500	666	**1330**	916	458	583	266	458	791	250
		500	833	1000	1330	1660	1660	**2660**	2330	1160	2000	1660	750	1500	500
N.C.T.C. 1797 (collec)	C	225	250	375	500	916	916	1160	1000	1330	**1500**	1330	1160	500	<100
		750	1660	1830	2000	2660	3000	4000	**4000**	**4000**	4000	3660	3660	3330	333
N.C.T.C. 366 (collec.)	D	<100	100	100	175	133	500	500	750	750	833	333	<100	<100	<100
		<100	375	500	1000	916	1500	1830	**2000**	1830	1830	1830	100	<100	<100
N.C.T.C. 1241 (collec.)	E	—	175	100	175	250	375	666	**1000**	**1000**	500	500	175	<100	—
		—	750	583	750	887	1330	2000	3000	**4000**	3660	3000	1000	150	—
N.C.T.C. 2077 (collec.)	F	<100	140	207	543	543	916	1500	1250	833	375	100	<100	<100	<100

Les valeurs consignées dans le tableau, exprimées en millions germes/ml de culture, représentent la moyenne de [illegible] d'une heure. Pour les souches où la seconde rangée manque on n'a effectué qu'une seule détermination.

CONCLUSIONS

1. A la suite des déterminations effectuées sur 30 souches de *Cl. perfringens* cultivées eu bouillon Pope, on a constaté que la température optimum pour le développement oscille entre 42° et 45°C, avec une fréquence maximum située entre 43° — 44°C. Cette constatation est en contradiction avec les données classiques, qui considèrent que la température la plus favorable pour la croissance du *Cl. perfringens* se situe entre 35° — 37°C, et confirme l'observation de Boyd, et coll. faite sur la souche B.P.$_6$K.

2. En étudiant l'influence de la température sur la toxinogenèse de la souche B.P.$_6$K on a réussi a confirmer les données classiques, les meilleurs résultats étant obtenus à 34° — 36°C. Il résulte donc, que pour le *Cl. perfringens* il existe un grand décalage entre la température optimum de développement et celle exigée par la toxinogenèse, caractère beaucoup moins marqué chez les autres germes toxigènes.

3. La culture du *Cl. perfringens* à 46° — 47°C (température préconisée par nous pour la méthode d'enrichissement) n'affecte pas la capacité toxigène des souches étudiées.

4. On a observé une température optimum de développement supérieure à 37°C aussi chez d'autres clostridies, telles: *Cl. oedematiens*, *Cl. chauvoei*, *Cl. tetanomorphum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. cochlearium*, *Cl. tertium*; ce caractère pourrait éventuellement permettre de différencier les clostridies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bergey's — Manual of Determinative Bacteriology, Ed. VI, 1957, Williams& Wilkins Baltimore.
2. Boyd M. I., Logan M. A., et Tytella A. A. — J. Biolchem, 1948, **174,** 1030.
3. Greer F. E. — J. Bact., 1926, **12,** 243.
4. Olaru A., Gorun V. et Neacşu V. — Arh. Rom. de Epidemiol. et Microbiol., 1956, 284. Ed. Med. Bucarest.
5. Săsărman A. et Horodniceanu T. — Arch. Roum de Path. Exp. et de Microbiologie, 1961, **20,** 471.
6. Săsărman A., Horodniceanu T., Solomon E. et Milosescu P. — Microbiologia, 1961, (sous presse).
7. Topley and Wilson's — Principles of Bacteriology and Immunity, 1955, Ed. Arnold, London.

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАЗВИТИЕ И ТОКСИГЕННЫЕ СВОЙСТВА *CL. PERFRINGENS*. ОПТИМАЛЬНЫЕ ЗОНЫ ТЕМПЕРАТУРА ДЛЯ КЛОСТРИДИЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Из исследований произведенных авторами на 30 штаммах *Cl. perfringens* культивирвванных в бульоне попа можно заключить, что оптимальная температура для развития *Cl. perfringens* варьирует от 42° до 45° с максимальной частотой при температуре 43—44°.

Это наблюдение находится в противоречии с классическими данными, согласно которым оптимальной температурой для развития *Cl. perfringens* является температурная зона в пределах 35—37°С. Таким образом подтверждается положение/Войда и сот. касающееся штамма B.P$_6$.K.

2. При исследовании влияния температуры на токсигенные свойства штамма B.P_6.К. были подтверждены классические данные. Самые лучшие результаты были получены при использовании температуры 34—36°С. Отсюда следует, что у *Cl. perfringens* наблюдается большой отрыв между оптимальной температурой развития и температурой необходимой для токсигенеза, что не встречается у других болезнетворных возбудителей.

3. Культивирование *Cl. perfringens* при температуре 46—47°С (эту температуру предложили авторы настоящей статьи в качестве метода обогащения) не отражается на токсигенных свойствах соответствующих штаммов.

4. Оптимальная температура развития, выше чем 37°С, встречается также и у других микроорганизмов этой группы, какими являются например: *Cl. oedematiens*, *Cl. chauvoei*, *Cl. tetanomorphum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. cochlearium*, *Cl. tertium* и таким образом это свойство может быть использовано для дифференцировки клостридий.

DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE ENTWICKLUNG UND TOXINBILDUNG BEI *CL. PERFRINGENS*. OPTIMALE TEMPERATUR ZONEN BEI DEN KLOSTRIDIEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus den durchgeführten Bestimmungen auf 30 Cl. perfringens Stämmen, in Pope-Nährboden gezüchtet, ergab sich, dass das Temperaturoptimum für die Entwicklung des *Cl. perfringens* zwischen 42° und 45°C, mit einem Häufigkeitsmaximum bei 43°—44°C liegt; diese Tatsache bestätigt Boyd's und Mitarbeiter Foraschungen, die er mit dem Stamm B.P_6K., durchgeführt hat.

Dies steht im Widerspruch zu den klassischen Angaben, wonach das Temperaturoptimum für die Entwicklung von *Cl. perfringens* in den Bereich von 35°—37°C fällt.

2. Eine Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Toxinbildung beim Stamm BP_6K bestätigte die klassischen Angaben, indem die besten Ergebnisse bei 34°—36°C erzielt wurden. Es besteht also bei *Cl. perfringens* eine starke Verschiebung zwischen dem Temperaturoptimum für die Entwicklung und dem für die Toxinbildung, was bei anderen Keimen nicht beobachtet wird.

3. Die Züchtung von *Cl. perfringens* bei 46°—47°C (d.h. bei der Temperatur, die von den Verfassern fur die Anreicherungsmethode vorgeschlagen wird) beeinträchtigt die Fähigkeit der betreffenden Stämme Toxin zu bilden nicht.

4. Auch bei anderen Vertretern dieser Gruppe, wie *Cl. oedematiens*, *Cl. chauvoei*, *Cl. tetanomorphum*, *Cl. bifermentans*, *Cl. cochlearium* und *Cl. tertium*, wird ein Temperaturoptimum der Entwicklung beobachtet, das oberhalb 37°C liegt. Dieses Merkmal könnte daher zur Differenzierung der Clostridien dienen.

THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON DEVELOPMENT AND TOXIN PRODUCTION OF *CL. PERFRINGENS*. OPTIMUM TEMPERATURE ZONES BY CLOSTRIDIUM

SUMMARY

1. The determinations performed on 30 strains of *Cl. perfringens*, cultivated in Pope's broth culture, have shown the optimum temperature for the development of *Cl. perfringens* to range from 42° to 45°C, the optimum for most of the strains being 43°—44°C confirming Boyd's et all. observation, carried out on strain B.P_6K.

This is in contradiction with classic data according to which the optimum temperature for the development of *Cl. perfringens* would range from 35° to 37°C.

2. A study of the influence exerted by temperature on toxin formation in strain B.P.$_6$K. confirmed the classic findings, the best results being obtained at 34°—36°C. Hence, there is a considerable discrepancy in *Cl. perfringens* between the temperature optimum of development and that required for toxin formation, a situation which is not met with in other germs.

3. Cultivation of *Cl. perfringens* at 46°—47° (i.e. the temperature suggested by the authors for the method of enrichment) does not interfere with the capacity of toxinproduct ion in the respective strains.

4. An optimum temperature for development which exceeds 37°C is likewise recorded in other members of this group, such as *Cl. oedematiens, Cl. chauvoei, Cl. tetanomorphum, Cl. bifermentans, Cl. cochlearium, Cl. tertium.* This character may thus be useful for the differentiation of clostridia.

ÉTUDE COMPARATIVE DE PLUSIEURS MÉTHODES POUR L'OBTENTION D'UN SÉRUM HÉMOLYTIQUE À TITRE ÉLEVÉ

par

C. Zilişteanu et Sofia Lescinschi

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Produits Biologiques)

— Manuscrit reçu le 26 juin 1961 —

Le sérum hémolytique est utilisé à présent sur une large échelle, spécialement dans la réaction de fixation du complément, pour le diagnostic de nombreuses maladies.

Dans certaines réactions, comme celle de type Bengtson, l'auteur de cette méthode (17), ainsi que Zdrodovski et Golinevici (19), Combiesco, Zarnea et coll. (21), reccomandent l'emploi des sérums hémolytiques à titre très élévé, — au dessus de 1/8000 — dont malheureusement l'obtention est difficile.

Les recherches en vue d'améliorer le titre du sérum hémolytique ont été nombreuses. Comme animaux pour l'immunisation, certains auteurs ont utilisé le cheval (7, 10), d'autres le cobaye (8), mais les meilleurs résultats ont été toutefois obtenus sur lapins. On a étudié différentes méthodes et schémas d'immunisation, concernant le mode de préparation des hématies, la voie d'immunisation (intraveineuse, intrapéritoneale ou souscutanée), la quantité d'hématies inoculées (dose unique ou doses répétées), l'administration de quantités progressives ou régressives d'hématies (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22). Ainsi, par inoculation de l'antigène (hématies de mouton), à la suite d'une infection expérimentale avec le b. tuberculeux bovin sur les cobayes, Lewis et Dorothy Loomis (8) ont obtenu des titres dépassant 20 fois ceux des témoins; Thompson (6) a obtenu de bons résultats sur lapins à la suite d'injections de tuberculine. Par contre, d'autres auteurs (9), après l'infection expérimentale des lapins avec des b. tuberculeux bovins ou humains, ne constatent pas les mêmes résultats. Certains auteurs (3, 15) ont employé comme adjuvant l'huile de vaséline additionnée de lanoline ou la vitamine C, mais n'ont pas obtenu de variation du titre par rapport au témoins; cependant, Jegorov (12) en combinant des hématies de moutons avec *B. Shiga-Kruse*, *B. para A* ou *para B*, a réussi à enregistrer une augmentation considérable du titre des sérums hémolytiques.

On a également étudié l'action des substances pharmacodynamiques sur le système nerveux végétatif, par stimulation du parasympathique avec de la pylocarpine, ou sa paralysie à l'aide de l'atropine, ou bien par l'excitation du sympathique par l'éphédrine, le titre de l'hémolysine étant augmenté chez les animaux dont le tonus parasympathique était élevé (14). Par contre, Vasilenko

(16) obtient de bons résultats en employant l'éphédrine afin d'éviter le choc anaphylactique.

Récemment, RUGE (22), utilisant pour l'immunisation des lapins du sérum aditionné d'hématies de mouton, a obtenu des sérums à titres très élevés.

Le présent travail reflète nos recherches en vue d'obtenir des sérums hémolytiques avec un titre élevé. A cette fin, nous avons étudié parallèlement plusieurs méthodes:

1. La méthode de KOLMER (18) préconisant l'emploi de doses régressives d'hématies (utilisée pour l'instant, à l'institut « Dr. I. Cantacuzino »);
2. La même méthode à laquelle on a associé de l'éphédrine;
3. La méthode préconisée par RUGE, et
4. La méthode de RUGE simplifiée par nous.

Nous soulignons que l'emploi de l'éphédrine nous a été suggéré par les bons résultats obtenus par nous dans la préparation du sérum anti-globulinique sur chèvre (23).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. *Animaux d'expérience*: lapins blancs ou chinchillas de 2500/3500 g. En vue d'obtenir des résultats comparables entre les différents lots expérimentaux, les animaux ont été répartis par groupes hétérogènes quant à leur poids (approximativement le même pour chaque lot).

2. *Méthodes d'immunisation des lapins*:

a) *Méthode de Kolmer*, avec quantités décroissantes d'hématies de mouton: 5; 3,5; 3; 2 et 2 ml injectées à cinq jours d'intervalle. A partir de la seconde inoculation, les animaux sont désensibilisés par voie intra-veineuse (30 minutes avant chaque inoculation) à l'aide d'une dilution d'hématies 1/10. Les hématies sont abondamment lavées au préalable à 5 ou 6 reprises avec la solution de chlorure de sodium isotonique, afin d'éliminer toute trace de protéine (contrôle à l'aide de l'acide sulfo-salicylique 25% ou acide nitritique nitreux — réactif Heller). Après le dernier lavage, les hématies sont ramenées au volume initial et diluées 1/2.

b) La même méthode que celle exposée au point *a*, injectant, en plus, à partir de la seconde inoculation d'hématies, 2 ctg d'ephédrine, 30 minutes avant l'introduction de l'antigène.

c) Méthode d'immunisation de RUGE: sérum +hématies de mouton selon le schéma:

Semaine	I		II			III		IV	
Jour	Mercredi	Vendredi	Lundi	Mercredi	Vendredi	Mercredi	Vendredi	Lundi	Mercredi
Sérum de mouton (i.v.)	0,5 ml	1 ml	1,3 ml	1,8 ml	2,3 ml	—	—	—	—
Hématies de mouton 10% lavées (i.v.)	—	—	—	—	—	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml

A partir de la troisième inoculation de sérum, les animaux sont désensibilisés, 30 minutes avant chaque injection de sérum ou d'hématies, par 0,2 ml sérum (voie sous-cutanée). Pour chaque injection, le sérum et les hématies sont prélevés d'un autre animal.

d) La même méthode de RUGE citée plus haut, mais en utilisant le sérum d'un seul animal pour toutes les inoculations et les hématies d'un même prélèvement pour les inoculations effectuées à 48 heures d'intervalle, les hématies étant lavées avant l'inoculation.

3. *Obtention des sérums.* La saignée à blanc des lapins s'effectue le 6—7-e jour à partir de la dernière inoculation d'hématies. Le sang, récolté dans des appareils spéciaux (20), est maintenu pendant 1 heure à 37°C. Après incubation on enlève le caillot du sérum par suspension; les appareils sont maintenus pendant 24 heures à +4°C; suit la décantation du sérum.

4. *Titrage du sérum hémolytique.* En vue du titrage, nous avons utilisé des hématies fraîches de mouton, lavées à trois reprises avec une solution de chlorure de sodium isotonique, suspendues de nouveau en 1,5% du sédiment et de l'alexine recoltée 18—20 heures auparavant, titrée au moment de l'emploi, ou en employant de l'alexine lyophilisée, également titrée, au moment de l'utilisation. Dans la réaction, on utilise 2 U alexiques.

5. *L'interprétation statistique* des résultats obtenus a été faite d'après les méthodes de la statistique mathématique, utilisant les symboles suivants:

x_i = chiffre qui multiplié par 10^{-3} représente l'inverse du titre du sérum.

y_i = nombre d'animaux; $n = \Sigma y_i$

$\bar{x}$ = moyenne des valeurs $x_i = \frac{1}{n} \cdot \Sigma x_i y_i$

S_{xx} = la somme des carrés des déviations $= \Sigma y_i (x_i - \bar{x})^2$

s^2 = le carré de la déviation standard $= \frac{S_{xx}}{n-1}$

s = déviation standard $= \sqrt{s_2}$

$s_{\bar{x}}$ = erreur standard de la moyenne $= \frac{s}{\sqrt{n}}$

La signification a été calculée selon la formule $= (\bar{x}_2 - \bar{x}_1) \left(\frac{s_1}{\sqrt{n_2}} \right)$

RÉSULTATS

Dans des recherches préliminaires, effectuées sur deux lots à dix lapins, nous avons comparé la méthode *a* avec la méthode *c*, obtenant par la méthode *c* des résultats nettement supérieurs.

Dans une deuxième série d'expériences — sur trois lots à 20 lapins — nous avons comparé les trois méthodes *a*, *b* et *c*; les résultats sont consignés dans le tableau I. Nous mentionnons que deux des animaux (un du lot *b* et un du lot *c)* sont morts par choc au cours des immunisations.

Tableau I

Titres des sérums hémolytiques obtenus par les méthodes d'immunisation a, b, et c

Titre de sérum $(x_i \cdot 10^3)^{-1}$	Méthode *a*	Méthode *b*	Méthode *c*
x_i	$y_{i(a)}$	$y_{i(b)}$	$y_{i(c)}$
1	3	2	0
2	7	3	0
4	6	4	0
8	2	5	3
16	1	4	5
32	1	1	8
64	0	0	3
Total animaux	20	19	19
$\bar{x}$	5,25	8,41	29,0
$S_{\overline{xx}}$	974	1098,66	5915
s^2	51,25	61	328,5
s	7,16	7,81	18,1
$s_{\bar{x}}$	1,6	1,79	4,15
Titre moyen et déviation standard *	5250±1600	8410±1790	29000±4150

* Valeurs réciproques

Legende: Méthode *a* = quantités décroissantes d'hématies (employés à l'Inst. Dr. I. Cantacuzin).
Méthode *b* = même méthode + éphédrine.
Méthode *c* = méthode RUGE(sérum + hématies de mouton).

$\bar{x}_a$ comparé á $\bar{x}_b = 1{,}95 < \alpha 5\%$

$\bar{x}_a$ „ „ $\bar{x}_c = 14{,}5 \gg \alpha 0{,}1\%$

$\bar{x}_b$ „ „ $\bar{x}_c = 11{,}5 \gg \alpha 0{,}1\%$

Du tableau I ressort la supériorité nette de la méthode d'immunisation *c*, par rapport aux deux autres méthodes — *a* et *b*. De même, la méthode *b* s'est avérée supérieure à la méthode *a*. Cependant, en déterminant la signification statistique de la différence entre les titres moyens obtenus par les trois méthodes, on obtient:

$\bar{x}_a$ comparé à $\bar{x}_b = 1{,}95 < \alpha_{5\%}$, donc une différence insignifiante entre les méthodes *a* et *b*; par contre:

$\bar{x}_a$ comparé à $\bar{x}_c = 14{,}5 \gg \alpha_{0{,}1\%}$ et

$\bar{x}_b$ comparé à $\bar{x}_c = 11{,}5 \gg \alpha_{0{,}1\%}$ ce qui démontre clairement la supériorité de la méthode *c* sur les méthodes *a* et *b*. Ainsi, dans cette série d'expériences, tenant compte aussi de la déviation standard, la moyenne des titres obtenus par la méthode *c* a été de 1/29.000±4.150, par rapport à 1/8.410±1.790 par la méthode *b* et 1/5.250±1.600 par la méthode *a*.

Dans une troisième série d'expériences — sur 2 lots d'animaux à 10 lapins — nous avons comparé la méthode d'immunisation *c* avec la méthode *d* afin d'éta-

blir si la provenance du sérum ainsi que des hématies, prélevés de différents animaux ou d'un seul, exerce une influence sur les résultats. Les données obtenues sont exposées dans le tableau II. A remarquer que dans le lot *d* nous avons de même enregistré la mort d'un lapin, également par choc.

Tableau II

Titres comparatifs des sérums hémolytiques obtenus par les méthodes d'immunisation c et d.

Titre du sérum $(x_i \cdot 10^3)^{-1}$ x_i	Méthode *c* y_i *(c)*	Méthode *d* $y_{i(d)}$	Total y_i *(c + d)*
4	1	0	1
8	2	2	4
16	0	1	1
20	1	1	2
24	2	1	3
32	1	2	3
40	0	1	1
50	1	0	1
64	1	0	1
80	1	0	1
128	0	1	1
Total animaux	10	9	19
$\bar{x}$	31,4	34,2	32,8
S_{xx}	5922,6	10853,56	16745,76
s^2	658,08	1356,7	930
s	25,6	36,8	30,5
$s_{\bar{x}}$	8,11	12,3	7,0
Titre moyen et déviation standard *	31400±8110	34200±12300	32800±7000

* Valeurs réciproques

Legende: Méthode *c* = méthode de RUGE-
Méthode *d* = méthode de RUGE modifiée (voir chap. matériel et méthodes).
$\bar{x}_c$ comparé à $x_d = 0{,}342 \ll \alpha_{5\%}$.

Des données du tableau II, par comparaison des titres moyens des deux méthodes *(c* et *d)*, il ressort: $0{,}342 < \alpha_{5\%}$, ce qui dénote une différence totalement insignifiante et que, par conséquent, la provenance des sérums d'immunisation et des hématies n'influence pas le titre des sérums obtenus, indifféremment s'ils sont prélevés d'un même ou de différents animaux.

Des données du tableau II on constate également la moyenne élevée des titres enregistrés sur 19 animaux, par les méthodes *c*+*d* (titre moyen=1/32.800± ±7.000).

La totalisation des titres obtenus par nous par les méthodes *c* et *d* est consignée dans le tableau III.

Tableau III

Totalisation des titres des sérums antihémolytiques obtenus par les méthodes d'immunisation selon Ruge (c et d).

Titre du sérum $(x_i \cdot 10^2)^{-1}$ x_i	Méthode c lot I y_i (c_I)	Méthode c + d lot II y_i ($c_{II}+d_{II}$)	Total méth. c + d Total y_i ($c_{I \cdot II}+d_{II}$)
4		1	1
8	3	4	7
16	5	1	6
20		2	2
24		3	3
32	8	3	11
40		1	1
50		1	1
64	3	1	4
80		1	1
128		1	1
Total y_i	19	19	38
$\bar{x}$	29,0	32,8	31,0
S_{xx}	5915	16745,76	22790
s^2	328,5	930	616
s	18,1	30,5	24,8
$s_{\bar{x}}$	4,15	7,0	4,02
Titre moyen et déviation standard *	29000±4150	32800±7000	31000±4020

* Valeurs reciproques

Légende: $\bar{x}_b$ comparé à $\bar{x}_{Ruge} = 17,8 \gg \alpha_{0,1\%}$

En comparant le titre moyen des sérums hémolytiques obtenus par la méthode *b* (tableau I) à celui de tous les sérums obtenus sur 38 animaux par les méthodes *c*+*d* (tableau III), il résulte: $17,8 \gg \alpha_{0,1\%}$, donc, une différence nettement significative.

Nous signalons que dans la deuxième série d'expériences (tableau I) ainsi que dans la troisième (tableau II), totalisant 38 lapins, auxquels on a appliqué les méthodes mixtes d'immunisation *(c* et *d)*, tous les animaux ont répondu à l'immunisation. Un seul animal a présenté un titre de 1/4.000, la moyenne des titres étant de 1/31.000±4020, avec des valeurs maxima atteignant 1/128.000.

DISCUSSION

En expérimentant en parallèle, quatre méthodes différentes de préparation du sérum hémolytique *(a, b, c,* et *d)*, les meilleurs résultats ont été obtenus par la méthode mixte d'immunisation d'après RUGE, sérum + hématies (*c*), méthode simplifiée par nous *(d)*, par l'emploi du sérum provenant d'un seul animal pour toutes les inculations et des hématies d'une seule saignée pour les inoculations effectuées à 48 heures d'intervalle.

Les différents lots de sérums obtenus, conservés comme tels, non-glycérinés, à +4°C, titrés trois fois dans l'intervalle de 6 mois, n'ont subi aucune modification du titre. Après l'addition de la glycérine, la stabilité des titres des sérums préparés par la méthode de RUGE s'est maintenue pendant 18 mois, date après laquelle nous ne les avons plus poursuivis.

Au cours de l'immunisation nous avons enregistré une perte de trois animaux par choc, donc une proportion de 7,89%, proportion inférieure à celle que donne d'habitude la méthode de KOLMER.

Le mécanisme qui pourrait expliquer l'efficacité de la méthode mixte d'immunisation est plus difficile à élucider. Il pourrait éventuellement être dû à l'immunisation avec des quantités progressives d'hématies, bien tolérées par les animaux à la suite des injections désensibilisantes de sérum, ou peut-être, par l'accumulation des anticorps-antisérums avec ceux antihématiques, agissant dans le test de titrage de l'hémolysine sur les hématies qui, bien que lavées, ont encore absorbé à leur surface des traces de sérum. Il se pourrait que les deux hypothèses soient valables.

Dans nos conditions d'expérience, la méthode mixte d'immunisation s'est avérée extrêmement valeureuse, surtout par la qualité des sérums, qui présentent des titres significatifs de beaucoup plus élevés que ceux obtenus par la méthode de KOLMER. Par conséquent, la préparation de ce sérum ne constitue pas un problème, en particulier pour son utilisation dans des réactions qui exigent des titres élevés. En second lieu, elle permet la réalisation d'économies importantes, par la réponse 100% des animaux immunisés et, en plus, par l'obtention des sérums à des titres qui permettent sans inconvénient de les glycériner à 50%.

CONCLUSIONS

1. Afin de préparer un sérum hémolytique anti-mouton à titre élevé, nous avons comparé quatre méthodes d'immunisation des lapins, les meilleurs résultats étant obtenus par la méthode mixte d'immunisation — sérum plus hématies (méthode de RUGE). L'emploi des sérums et des hématies provenant d'un même animal (technique RUGE, modifiée par nous) ou provenant de différents animaux (méthode RUGE), n'influence pas la valeur des titres enregistrés.

2. Par cette méthode, nous avons obtenus des sérums avec des titres moyens oscillant entre 1/29.000±4.150 et 1/32.800±7.000, titres qui dépassent de manière significative les titres obtenus par les méthodes antérieures.

3. L'application de cette méthode, permet de réaliser des économies importantes par l'augmentation quantitative du sérum, qui peut être glycériné 50%, par la réponse 100% des animaux immunisés et par l'obtention d'un produit de

qualité qui assure l'exécution — dans les meilleures conditions — des réactions sérologiques exigeant un titre élevé du sérum hémolytique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Arlo J. et Certain B. — C. R. Soc. Biol., 1913, **75**, 552
2. Sezary A. — C.R. Soc. Biol., 1917, **80**, 797
3. Rubinstein M. — C.R. Soc. Biol., 1917, **80**, 908
4. Rubinstein M. — C.R. Soc. Biol., 1918, **81**, 303
5. Sezary A. — C.R. Soc. Biol., 1918, **81**, 310
6. Thompson H. L. — J. Med. Research, 1920, **10**, 37
7. Okell C. C. et Parish H. J. — Brit. J. of exper. Path., 1924, **5**, 355
8. Lewis P. A. et Loomys D. — J. exp. Med., 1924, **40**, 503
9. Hektoen L. et Corper H. J. — J. infec. diseases, 1925, **37**, 82
10. Borowskaia D. — Zbl. f. Bakt. Parasit. u. Infekkr., 1926, **98**, 425
11. Dold H. et Gross H. — Zbl. f. Bakt. Parasit. u. Infekkr., 1927, **104**, 343
12. Jegorov A. — Trav. hyg. publ. tchechoslovaques., 1937, 111, Prague
13. Magerl J. — Ztschrft. f. Immunit., 1937, **90**, 330
14. Illenyi A. et Borzsak L. — Ztschrf. f. Immunit., 1938, **94**, 79
15. Gross H. et Henning G. — Ztschrft. f. Immunit., 1942, **101**, 364
16. Vasilenko A. A. — J. Mikrobiol., Epidemiol. i Immunobiol., 1942, **2**, 89
17. Bengtson I. A. - Publ. Health Rep., 1944, **59**, 402
18. Kolmer J. A., Spaulding E. H. et Robinson H. — Approved Laboratory Technic, ed. V, Ed. Appleton, 1951, 1193, London
19. Zdrodovski F. P. et Golinevici E. M. — Ucenie o rikketsiah i rikketsiosah., Ed. Medgiz, Moskva, 1953, 282
20. Olinici N. — Microbiol., Parasitol., Epidemiol., 1957, **2**, 364
21. Combiesco D., Zarnea G., Dinculesco D. et coll. — Arch., Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 23
22. Ruge H. — Zbl. f. Bakt. Parasit. u. Infekkr., 1960, **177**, 95
23. Zilișteanu C.. Mitrica Natalia, Lescinski Sofia — (sous presse)

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ С ПОВЫШЕННЫМ ТИТРОМ, РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Для приготовления гемолитической сыворотки «антиовца» с повышенным титром, авторы сравнивали 4 метода иммунизации кроликов, причем наилучшие результаты были получены при использовании смешанного метода иммунизации: сыворотка + красные кровяные шарики (метод Руге). Использование сыворотки и эритроцитов, полученных у того же животного (изменение внесенное авторами), или же полученных у различных животных — по методу Руге — не влияет на значения полученных титров.

2. При помощи этого метода были получены сыворотки, обладающие средним титром в пределах 1:29.000±4.150 и 1:32.800±7000; эти титры значительно превосходят титры, полученные при применении использованных нами до настоящего времени методов.

3. Таким путем получили большую экономию в смысле увеличения количества сыворотки, которая может быть приготовлена с добавлением 50% глицерина, наличия 100% положительной ответной реакции при иммунизации животных; вместе с этим этот высококачественный препарат обеспечивает проведение в наилучших условиях серологических реакций, требующих высокого титра гемолитической сыворотки.

HERSTELLUNG EINES HOCHWERTIGEN HÄMOLYTISCHEN SERUMS, VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNG MEHRERER METHODEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Hinblick auf die Herstellung eines hochwertigen hämolytischen Serums gegen Schafblutkörperchen, wurden vier Methoden der Kaninchenimmunisierung verglichen. Die besten Ergebnisse wurden mit der Methode der gemischten Immunisierung (Serum und rote Blutkörperchen), nach RUGE, erzielt. Die Verwendung von Serum und Blutkörperchen des gleichen Tieres (von uns eingeführte Abänderungen) oder von verschiedenen Tieren, nach RUGE, beeinflusst die Titerhöhe nicht.

2. Mit dieser Methode wurden hochwertige Sera erhalten, deren mittlere Titer $1/29.000 \pm 4.150$ bis $1/32.800 \pm 7.000$ betrugen, was die mit den bisher von uns verwendeten Methoden erzielten Werte bedeutend übertrifft.

3. Auf diese Weise konnten durch die mengenmässige Steigerung der Sera, die einen 50 prozentigen Glyzerinzusatz vertragen und durch das 100 prozentige Ansprechen der immunisierten Tiere, bedeutende Ersparnisse erzielt werden. Gleichzeitig wurde ein hochwertiges Reagens erhalten, welches die Ausführung der serologischen Reaktionen, die hämolytische Sera mit hohem Titer erfordern, unter den günstigsten Bedingungen gewährleistet.

PREPARATION OF A HIGH-GRADE HAEMOLYTIC SERUM, A COMPARATIVE STUDY OF SEVERAL METHODS

SUMMARY

1. In view of the preparation of a high-grade haemolytic serum against sheep red cells, we have compared four methods of rabbit immunisation. The best results were obtained with the method of associated immunization (serum + red cells) according to RUGE. The use of serum and of red cells from the same animal (a modification introduced by us) or from different animals (according to RUGE) exerts no influence on the titre levels recorded.

2. By means of this method, sera were obtained whose mean titres ranged from $1/29.000 \pm 4.150$ to $1/32.800 \pm 7.000$. These titres are significantly higher than those obtained by means of the methods we have so far been using.

3. Important economies have been achieved in this way owing to a quantitative increase of the serum, to which 50 per cent glycerin may be added, and to the 100 per cent response of the animals during immunization. At the same time, a high-grade product has been made available, which insures the performance under optimum conditions of serological reactions requiring hightitred haemolytic sera.

SUR L'INCIDENCE DU *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TYPE « F » ET TYPE « A » THERMORÉSISTANT, DANS L'INTESTIN DE SUJETS SAINS

par

THEA HORODNICEANU et A. SĂSĂRMAN

avec la collaboration technique de MARIA DOSPINA, RODICA CIULLEV et MARIA KÖVARY

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cultures Microbiennes)

— Manuscrit reçu le 10 juin 1961 —

La période 1947—1949 a connu en Allemagne de nombreux cas d'une nouvelle maladie très grave: l'entérite nécrosante due à des souches de *Cl. perfringens* (7, 12, 13, 16, 18). Les caractères spéciaux de ces souches, représentés par la grande thermorésistance des spores et par l'élaboration d'une toxine particulière (facteurs toxiques α, β, γ), ont permis leur individualisation comme un type indépendant, le type « F », considéré par PRÉVOT comme une variante *(hominitoxicus)* du type « B » (11, 13).

Dans la même période, on a également réussi à isoler en Allemagne ce même type « F » chez des porteurs sains de germes, leur pourcentage atteignant 16% de la population contrôlée à Hambourg; toutefois, les souches respectives étaient moins pathogènes que celles isolées des malades (6).

Récemment, en U.R.S.S., BÎCENKO et BULATOVA (1) étudiant 110 souches de *Cl. perfringens* de collection, non-typées, ont trouvé qu'une de ces souches, isolée d'un cas léthal de toxi-infection alimentaire, apparteanit au type « F ».

Le type « F » ne représente toutefois pas le seul type de *Cl. perfringens* à spores thermorésistantes, qui soit pathogène pour l'homme; en effet, ainsi qu'il résulte de travaux récents, on rencontre des souches thermorésistantes aussi chez le type « A ». Ainsi, HOBBS et coll. (9) ont décrit une série d'explosions de toxi-infections alimentaires déterminées par des souches de *Cl. perfringens* type « A » caractérisées, dans la majorité des cas, (89,9%) par la résistance élevée à des spores à la chaleur. Par la suite, d'autres auteurs (3,14) ont confirmé la présence du type « A » thermorésistant dans des toxi-infections alimentaires et BRIDSON (2) a décrit une méthode simplifiée pour l'isolement du *Cl. perfringens* thermorésistant des fèces. HOBBS et coll. (9), étudiant la présence de ces souches chez les sujets sains, ont trouvé un pourcentage d'environ 2% de porteurs sains parmi les personnes examinées; BÎCENKO et BULATOVA (1), poursuivant les recher-

* Une analyse détaillée du problème concernant le type « F » est consacrée dans la monographie de PRÉVOT (13) et dans le travail de BICENKO et BULATOVA (1).

ches faites sur 110 souches de *Cl. perfringens* de collection, non-typées, ont réussi à identifier deux souches appartenant au type « A » thermorésistant.

Etant donné l'importance de ces deux types de *Cl. perfringens* et le fait qu'ils n'ont pas été signalés en Roumanie jusqu'à présent, nous avons essayé d'étudier le problème de leur présence chez les sujets sains.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nous avons d'abord déterminé la résistance des spores à la chaleur de quelques souches de collection appartenant au type « A » (souches Lechien, NCTC 1941, B.P.$_6$K., M, 12 RS) et au type « F » (NCTC 2077), utilisant pour la sporulation le milieu Ellner (5). Le milieu a été abondamment ensemencé avec une culture de 4—5 heures en bouillon Vf. Après incubation de 5 jours à 37°C, on a contrôlé la sporulation, puis la culture a été répartie en 6 échantillons maintenus à la température de 100°C., respectivement pendant 5, 10, 15, 30, 60 et 120 minutes. On a effectué, après inactivation, des ensemencements de chaque échantillon en bouillon Vf., les incubant ensuite en anaérobiose. Les cultures ont été observées pendant 7 jours.

On a déterminé par la même méthode la résistance des spores de 100 souches de *Cl. perfringens*, isolées par coproculture d'individus sains, qui se sont avérés porteurs en proportion de 96% (15).

Les souches thermorésistantes ont été étudiées du point de vue morphologique, propriétés culturelles, biochimiques, toxinogéniques et pathogéniques.

On a obtenu l'élaboration de la toxine par ensemencement des souches en bouillon Pope, glucosé 1%, incubé pendant 14 heures à 37°C. Le titrage des toxines a été fait « in vitro », en déterminant la dose minimum lécithinasique et « in vivo » en établissant la DLM pour souris.

Le typage des souches thermorésistantes a été effectué par le test de neutralisation des toxines avec des sérums spécifiques*. N'ayant eu à notre disposition un sérum de type « F » standard, nous avons utilisé un sérum non-standardisé, préparé sur chevaux en utilisant l'anatoxine spécifique de type.

Pour les tests de neutralisation on a d'abord déterminé les dilutions des sérums de type « A » et « F », qui neutralisent « in vivo » des quantités équivalentes (environ 250 DLM) de la toxine correspondante produite par les souches de collection B.P.$_6$K. de type « A » et NCTC 2077 de type « F ». Ensuite, on a mis en contact les dilutions des deux sérums, partant du titre trouvé (dilution maximum à laquelle le sérum neutralisait encore la toxine correspondante) avec des volumes égaux des toxines non-diluées des souches thermorésistantes; les mélanges obtenus après incubation de 30 minutes à 37°C ont été inoculés par voie intraveineuse aux souris. Le type a été indiqué par le sérum qui neutralisait la toxine respective dans la plus grande dilution par rapport au titre initial.

La pathogénité des souches a été déterminée par l'inoculation aux cobayes (voie intramusculaire) de quantités variables de culture de 18 heures en bouillon Vf.

* Nous présentons nos remerciements aux docteurs A. Olaru, J. Bittner et V. Voinesco du Service des Anaérobies de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » pour avoir mis à notre disposition les sérums de type « A » et « F ».

RÉSULTATS

La thermorésistance des spores de la souche de collection de *Cl. perfringens* type « F » a été de 15 minutes (100°C); les spores des souches de collection de type « A » n'ont pas résisté 5 minutes à 100°C.

Parmi les 100 souches sur lesquelles on a déterminé la thermorésistance des spores, 8 ont résisté pendant 15 minutes à 100°C, le reste de 92 souches ne résistant pas même 5 minutes à la même température.

Les résultats des titrages des toxines élaborées par les souches themorésistantes sont consignés dans le tableau I.

Tableau I

Titre « in vivo » et « in vitro » des toxines produites par les 8 souches thermorésistantes et pathogénité des souches respectives

Souche	DML (lécithinase)	DLM (souris)	Pathogénité (cobaye)	Résultat obtenu par le test de neutralisation
10	1/128	1/8	2 ml	Type « A » thermorésistant
18	—	—	5 ml	
26	1/16	—	2 ml	
39	1/8	1/8	0,5 ml	Type «F »
57	1/8	—	5 ml	
59	1/4	1/4	5 ml	Type « F »
96	1/256	1/4	0,5 ml	Type « A » thermorésistant
100	1/2	—	2 ml	

Il ressort du tableau I que seulement deux souches (nos. 10 et 96) ont produit de grandes quantités de lécithinase, s'avérant au test de neutralisation comme appartenant au type « A ». Le reste des souches ont produit des quantités réduites de lécithinase.

Des 8 souches thermorésistantes, seulement 4 ont produit une toxine qui a constamment tué la souris, mais en dilutions faibles (1/4—1/8).

Les tests de neutralisation, effectués par le sérum spécifique des toxines de type « A » et « F » élaborées par les souches de collection ont, donné un titre de 1/64 pour le sérum « A » et de 1/4 pour le sérum « F ». Les résultats des tests de neutralisation par le sérum de type « A » et « F » pour les toxines des 4 souches thermorésistantes qui ont constamment tué la souris, sont présentés dans le tableau II.

Il ressort du tableau II que la toxine sécrétée par la souche 10 est neutralisée par le sérum « A » jusqu'à une dilution dépassant 16 fois le titre, tandis que le sérum « F » la neutralise jusqu'à une dilution 8 fois plus élevée que le titre. Ce fait prouve qu'il s'agit d'une toxine de type « A », ce qui était d'ailleurs déjà évident par la détermination de l'action lécithinasique. La toxine 39 est neutralisée par le sérum « A » au titre, tandis que le sérum « F » la neutralise jusqu'à une dilution dépassant 8 fois le titre; il s'agit donc d'une souche de type « F ». La toxine 59 n'est pas neutralisée par le sérum type « A », mais elle l'est

par le sérum « F » jusqu'à une dilution 4 fois plus élevée que le titre: elle est donc une toxine de type « F ». La toxine 96 est neutralisée par le sérum « A » jusqu'à la dilution dépassant 16 fois son titre; elle est neutralisée par le sérum « F » seulement jusqu'à une dilution 4 fois plus élevée que le titre. Ainsi que dans le cas de la toxine 10, il s'agit de même d'une toxine de type « A », ce qui était d'ailleurs évident à la suite de la détermination de l'action lécithinasique.

Tableau II

Neutralisation par sérum de type « A » et « F » des toxines de Cl. perfringens de type « A » et « F » de collection et des toxines élaborées par les souches de Cl. perfringens thermorésistent isolées de l'intestin

Toxine	Dilutions de sérum type « A »					Dilutions de sérum type « F »				
	1/64*	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/4**	1/8	1/16	1/32	1/64
B.P.$_6$K (type « A ») (environ 250 DLM).	+	-	—	—	—	—	—	—	—	—
NCTC 2077 (type «F») (environ 250 DLM)	—	—	—	—	—	+		—	—	—
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
39	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—
59	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—
96	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—

Légende: + = neutralisation
— = absence de neutralisation
* = la dilution 1/64 représente le titre du sérum anti-perfringens « A »
** = la dilution 1/4 représente le titre du sérum anti-perfringens «F»

Les résultats du test de pathogénité pour les souches thermorésistantes (tableau I) montrent qu'il s'agit en général de souches faiblement pathogènes, seulement 2 souches sur 8 ayant une action léthale pour le cobaye, en dose de 0,5 ml. Les autres souches ont présenté une pathogénité variant entre 2—5 ml culture.

DISCUSSION

La résistance à l'ébullition des spores de *Cl. perfringens* type « F » développées en milieu Ellner a été, pour la souche NCTC 2077, de 15 minutes, tandis que les auteurs allemands (18) utilisant pour la sporulation un milieu avec cerveau, ont trouvé que la résistance à 100°C des spores du type « F » varie de 1 à 4 heures. Il résulte donc que les spores formées en milieu Ellner sont moins résistantes que les spores développées sur d'autres milieux. Nous avons préféré toutefois ce milieu de culture, vu qu'il permet une sporulation constante et abondante. A la suite de cette constatation, on a considéré comme thermorésistantes les souches dont les spores résistent au moins 15 minutes à 100°C, c'est-à-dire pendant un laps de temps égal à celui des spores du type « F » de collection.

Les spores de collection de type « A » n'ont resisté pas même 5 minutes à 100°, ce qui confirme la faible résistance à la chaleur de la majorité des souches appartenant à ce type (8, 13, 17).

La détermination de la résistance des spores des souches de *Cl. perfringens* isolées de l'intestin a mis en évidence l'existence de 8 souches thermorésistantes. Par comparaison, nous signalons que HAIN (6) trouve des porteurs de *Cl. perfringens* thermorésistant en proportion de 16% ; il considère que ces souches sont de type « F », sans effectuer toutefois les tests de neutralisation respectifs. DIECKMAN (4) constate parmi les souches de la collection du Prof. ZEISSLER l'existence de deux souches de *Cl. perfringens* thermorésistant et les considère également de type « F ». BICENKO et BULATOVA (1) trouvent parmi 110 souches de *Cl. perfringens* de collection, non-typées, 29 souches thermorésistantes dont ils n'ont réussi à typer que trois. Les faits constatés par nous révèlent que le nombre des souches de *Cl. perfringens* possédant des spores résistantes à la chaleur n'est pas à négliger.

Les résultats obtenus par nous, à la suite du typage des souches thermorésistantes ont prouvé l'existence du type « F » chez les porteurs sains en taux d'environ 2%, bien qu'en Roumanie on n'ait pas signalé des cas d'entérite nécrosante déterminée par le type «F ». Ce fait démontre que la simple présence du type « F » n'est pas suffisante pour provoquer l'entérite nécrosante, certaines conditions favorisantes étant nécessaires, conditions qui ont été réalisées une seule fois jusqu'à présent pour une période courte et sur un territoire limité. Toutefois, l'éventualité d'une nouvelle apparition des mêmes conditions ne peut être exclue, ce qui pourrait déterminer une exacerbation de la virulence des souches des porteurs et, par conséquent, l'apparition de cas d'entérite nécrosante.

En même temps, l'existence de porteurs de *Cl. perfringens* type « A » thermorésistant dans une proportion d'approximativement 2% — valeur constatée également par HOBBS et coll (9) — laisse entrevoir la possibilité d'un déclanchement de toxi-infections alimentaires déterminées par le *Cl. perfringens*.

Des faits exposés ressort la nécessité de rechercher les types « F » et « A » thermorésistants dans différents troubles digestifs (entérite, toxi-infection alimentaire) à étiologie inconnue.

CONCLUSIONS

1. La résistance des spores de *Cl. perfringens* type « F » formées en milieu Ellner est plus faible qu'en utilisant d'autres milieux; néanmoins ce milieu est préférable, permettant une sporulation constante et abondante.

2. La détermination de la résistance des spores de 100 souches de *Cl. perfringens*, isolées de l'intestin, a montré l'existence d'environ 8% de porteurs sains de *Cl. perfringens* thermorésistant.

3. Le typage des souches thermorésistantes avec du sérum spécifique a permis l'identification de deux souches de type « F » et deux de type « A », quatre souches étant non-typables à cause de la production de quantités réduites de toxines. Ainsi, bien qu'en Roumanie on n'ait pas signalé jusqu'à présant de cas d'entérite nécrosante ou de toxi-infection alimentaire dues au type « A » thermorésistant, on a trouvé un pourcentage approximatif de 2% porteurs sains de *Cl. perfringens* type « F » et 2% de *Cl. perfringens* type « A » thermorésistant.

4. La pathogénité des souches thermorésistantes isolées s'est révélée en général faible pour les cobayes, variant pour les souches étudiées de 0,5 jusqu'à 5 ml culture.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bicenko B. D. et Bulatova T. I. — J. Mikrobiol. Epidemiol. i Immunobiol., 1959, no. 1, 85
2. Bridson E. Y. — J. Mad. Lab. Technol., 1955, **13,** 175
3. Collee J. G. — J. Roy. Army Med., 1954, **100,** 296
4. Dieckmann C. — Brit. Med. J., 1949, no. 4597, 270
5. Ellner P. D. — J. Bact., 1956, **71,** 495
6. Hain E. — Brit. Med. J., 1949, no. 4597, 271
7. Hain E. — Brit. Med. J., 1949, no. 4597, 271
8. Headlee M. R. — J. Inf. Dis., 1931, **48,** 468
9. Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H. et Cruickshank J. C. — J. Hyg., 1953, **51,** 75
10. Oakley C. L. — Brit. Med. J., 1949, no. 4597, 269
11. Prévot A. R. — Ann. Inst. Pasteur, 1949, **76,** 492
12. Prévot A. R. — La semaine des Hôpitaux, 1949, 1637
13. Prévot A. R. — Biologie des maladies dues aux anaérobies, Ed. Flammarion, Paris, 1955
14. Smith J., et Wallace J. M. — Health Bull., 1956, **14,** 31
15. Săsărman A., et Horodniceanu T. — Arch. Roum. de Pathol. exp. et de Microbiologie, 1961, **20,** 471
16. Schutz — Dtsche. Med. Wschrift, 1948, **73,** 176
17. Weinberg M., Nativelle R. et Prevot A. R. — Les microbes anaérobies, Ed. Masson, Paris, 1937
18. Zeissler J. et Rassfeld-Sternberg L. — Brit. Med. J., 1949, no. 4597, 267

ЧАСТОТА *CL. PERFRINGENS* ТИПА «*F*» и ТЕРМОРЕЗИСТЕНТНОГО ТИПА «А» В КИШЕЧНИКЕ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Резистентность спор *Cl. perfringens* типа «*F*», образованных в среде Эллнера, является более слабой, чем когда применяются другие питательные среды; питательную среду Эллнера следует предпочитать, так как постоянно получается более обильное формирование спор.

2. Определение резистентности спор *Cl. perfringens* в случае 100 штаммов этого микроорганизма выделенных из кишечника, указапо на существование приблизитеально 8% носителей терморезистентных *Cl. perfringens.*

3. В результате типирования терморезистентных штаммов с помощью специфической сыворотки, были идентифицированы 2 штамма типа «F» и 2 штамма типа «А». 4 штамма не могли быть типированы вследствие весьма малых количеств полученного токсина. Следовательно, несмотря на то что у нас в стране до настоящего времени не было отмечено случаев токсического энтерита или же пищевых токсико-инфекций вызываемых терморезистентным типом «А», существует все же 2% носителей *Cl. perfringens* типа «F» и 2% носителей *Cl. perfringens* терморезистент ного тива «А».

4. Патогенность выделенных автором терморезистентных штаммов оказалась вообще слабой и она варьировала у исследованных штаммов в пределах 0,5—5 мл культуры в отношении морских свинок.

DAS VORKOMMEN VON *CL. PERFRINGENS* STÄMMEN TYPUS « F » UND THERMORESISTENTER TYPUS « A » IM DARM GESUNDER INDIVIDEN

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Thermoresistenz der in Ellnerscher Nährlösung gebildeten Sporen von *Cl. perfringens* Typus « F » ist geringer als bei Verwendung anderer Nährböden. Die Ellnersche Nährlösung ist jedoch vorzuziehen, da sie eine konstante und reichliche Sporenbildung gewährleistet.

2. Die Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der Sporen bei 100 aus dem Darm isolierten Stämmen von *Cl. perfringens* ergab etwa 8% Bazillenträger thermoresistenter Stämme.

3. Mit Hilfe typenspezifischer Seren konnten, unter den thermoresistenten Stämmen, 2 Stämme des Typus « F » und 2 Stämme des Typus « A » identifiziert werden. Vier Stämme konnten wegen zu geringer Toxinbildung nicht bestimmt werden. Folglich gibt es, obwohl Fälle von nekrotischer Enteritis oder Lebensmittelvergiftung durch den thermoresistenten Typus « A » bisher in unserem Lande nicht verzeichnet wurden, einen Prozentsatz von 2% Trägern des thermoresistenten *Cl. perfringens* Typus « F » und des thermoresistenten *Cl. perfringens* Typus « A ».

4. Die Pathogenität der isolierten thermoresistenten Stämme erwies sich im allgemeinen als gering und schwankte bei den untersuchten Stämmen zwischen 0,5 und 5 ml der Kultur (für Meerschweinchen).

THE INCIDENCE RATE OF *CL. PERFRINGENS* TYPE « F » AND THERMORESIST ANTTYPE « A » IN THE INTESTINE OF HEALTHY SUBJECTS

SUMMARY

1. The resistance of *Cl. perfringens* type « F » spores formed in Ellner's medium is lower than that of spores formed in other media, but Ellner's medium is to be preferred since sporulation is more constant and abundant in this case.

2. Resistance determinations in spores of 100 *Cl. perfringens* strains isolated from the intestine revealed the existence of about 8 per cent. carriers of thermoresistant *Cl. perfringens*.

3. Typing of the thermoresistant strains by means of a specific serum resulted in the identification of two strains belonging to the type « F » and of two strains belonging to type « A », four strains could not be typed because of insufficient toxin production. Hence, although no cases of necrotic enteritis or food poisoning due to the thermoresistant type « A » have so far been reported in this country, there are about 2 per cent, carriers of thermoresistant *C. perfringens* type « F » and 2 per cent carriers of thermoresistant *Cl. perfringens* type « A ».

4. The pathogenicity of the thermoresistant strains isolated proved as a rule to be low; in the strains under investigation it ranged from 0.5—5 ml. of the culture (in guinea-pigs).

L'ACTION DE L'ACIDE ÉTHYLÈNE-DIAMINO-TÉTRA-ACÉTIQUE (E.D.T.A.) SUR L'INTOXICATION ET L'INFECTION EXPÉRIMENTALE AVEC LE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* TYPE A

Note II. LE POUVOIR PRÉVENTIF DE Na_2 EDTA Ca CONTRE L'INTOXICATION EXPÉRIMENTALE AVEC L'ALPHA-TOXINE-PERFRINGENS

par

J. BITTNER, VIORICA VOINESCO et D. WINTER

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Anaérobies et de l'Institut de Recherches Chimico-Pharmaceutiques)

— Manuscrit reçu le 22 novembre 1960 —

Dans une note antérieure (1) nous avons exposé l'action de l'acide EDTA et de ses complexonates métalliques tels Ca_2 EDTA Na et Zn EDTA Na_2 sur la lécithinase alpha du *Clostridium perfringens* type A. Ayant en vue le mécanisme de l'action de ces agents chélateurs, nous nous posions le problème de leur emploi dans la lutte contre l'intoxication et l'infection avec le *Cl. perfringens* type A, ainsi que l'avaient montré antérieurement MOSKOWITZ (2), MOSKOWITZ, DEVERELLE et MC KINNEY (3), MOSKOWITZ (4). —

Dans le présent travail nous exposons les résultats obtenus par l'emploi du Na_2 EDTA Ca pour la protection des souris blanches contre l'intoxication expérimentale avec l'alpha-toxine *Cl. perfringens*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

A) *Matériel utilisé*: 1. De même que dans le travail antérieur (1) nous avons utilisé le Na_2 EDTA Ca, synthétisé par l'Institut des Recherches Chimico-Pharmaceutiques de Bucarest, dilué, selon la nécessité, dans du sérum physiologique en concentrations allant de 0,33—5%.

2. La toxine LVII No. 17 sèche du *Cl. perfringens* B.P_6 K. et l'émulsion de jaune d'oeuf ont été utilisées dans les conditions exposées dans la note précédente. Le poids des souris blanches employées a varié entre 16—20 g.

B) *Méthodes*: Afin de réaliser les conditions les plus proches de celles de la résorption naturelle de la toxine, nous avons renoncé à l'administration par voie intraveineuse, employée dans la note antérieure, en injectant la toxine par voie souscutanée. La DMM établie par voie souscutanée, a été égale à 0,22 mg de toxine No. 17, inoculée en volume de 0,5 ml (sérum physiologique) dans le flanc de l'animal; 2 DMM étaient également contenues dans 0,5 ml sérum physiologique. La solution de Na_2 EDTA Ca a été injectée par voie souscutanée, mais dans le flanc opposé.

RÉSULTATS.

1. Dans une première expérience on a essayé d'établir la quantité minimum de Na_2 EDTA Ca capable de conférer aux souris une protection de 100% envers 2 DMM, en cas d'administration simultanée de la toxine et de l'agent protecteur. Dans ce but nous avons eu recours au schéma utilisée par MOSKOWITZ (2). Des données du tableau I on peut voir que les résultats obtenus ont été très ressemblants, bien que nos conditions de travail aient été légèrement différentes de celles de MOSKOWITZ (nous avons utilisé de la toxine sèche au lieu de la toxine brute).

Tableau I

Effet protecteur des différentes quantités de Na_2EDTA Ca sur les souris intoxiquées en même temps avec 2 DMM toxine perfringens

Conc. Na_2EDTA Ca injectée %	Quantité mg	DMM injectées	Expérience du présent travail	Expérience de Moskowitz (2)
			Nombre de survivants / Total animaux injectés	
5,00	25,0	2	10/10	10/10
2,50	12,5	2	8/10	8/10
1,00	5,0	2	8/10	7/10
0,33	1,7	2	1/10	3/10
—	—	2	0/10	0/10

2. Ultérieurement, nous avons étudié dans quelle mesure la quantité de NA_2 EDTA Ca (25 mg) — reconnue comme étant la plus efficace par l'expérience précédente — peut encore défendre l'animal en cas d'inoculations à différents intervalles, après l'administration de 2 DMM de toxine. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

Tableau II

Effet protecteur chez la souris, obtenu par l'administration de Na_2EDTA Ca, à différents intervalles, après l'inoculation de 2 DMM toxine perfringens

Quantité de toxine injectée	Quantité de Na_2 EDTA Ca injectée	Intervalle entre l'injection de la toxine et du Na_2 EDTA Ca	Nombre des survivants / Nombre d'animaux injectés
2 DMM	25 mg	immédiatement	10/10
»	»	30′	10/10
»	»	60′	9/10
»	»	90′	5/10
»	»	120′	5/10
»	»	150′	2/10
»	»	180′	0/10
»	»	210′	0/10
1 DMM	—	—	0/10

Cette expérience prouve l'existence d'une dépendence nette entre le moment de l'administration du Na_2 EDTA Ca après l'intoxication et la possibilité de sauver les animaux; cette possibilité diminue proportionnellement au temps écoulé, devenant nulle après 3 heures.

3. Afin d'établir le rythme dans lequel la toxine perfringens se fixe dans l'organisme de la souris, ainsi que le mécanisme de l'action du Na_2 EDTA Ca, nous avons effectué une expérience similaire à la précédente, dans laquelle on n'a injecté que 1 DMM toxine. Les résultats sont présentés dans le tableau III.

Tableau III

Effet protecteur obtenu chez la souris par l'administration de Na_2EDTA Ca à différents intervalles, après l'inoculation de 1 DMM toxine

Quantité de toxine injectée	Quantité de Ca EDTA Na_2 injectée	Intervalle entre l'administration de Ca EDTA Na_2 et la toxine	Nombre des survivants / Nombre d'animaux injectés
1 DMM	25 mg	60′	4/5
»	»	90′	4/5
»	»	120′	5/5
»	»	150′	4/5
»	»	180′	4/5
»	»	210′	2/5
»	»	240′	3/5
»	»	270′	1/5
»	»	300′	3/5
»	»	330′	1/5
»	»	360′	1/5
»	»	390′	0/5
»	»	—	0/5

Il ressort de cette expérience qu'à la suite de l'intoxication avec 1 DMM toxine, le Na_2 EDTA Ca devient totalement inefficace seulement après 6.1/2 heures. A titre de comparaison, nous soulignons que MOSKOWITZ (3) a constaté que l'effet protecteur du Na_2 EDTA Ca, 6 heures après l'intoxication, ne s'exerce que sur une partie des souris intoxiqueés; il est nul 8 heures après l'intoxication.

4. Dans l'expérience suivante, nous avons étudié la tolérance de la souris envers l'administration répétée de Na_2 EDTA Ca. Les résultats sont exposés dans le tableau IV, qui montre que les animaux qui ont reçu au cours de 4 heures 75 mg Na_2 EDTA Ca n'ont présenté aucun phénomène pathologique pendant la période d'observation (10 jours).

5. Basés sur ces résultats nous avons cherché à déterminer si l'administration répétée du composé EDTA peut augmenter les chances de survie des animaux, dans le cas où le traitement a été commencé au moment établi comme défavorable par les expériences antérieures (3 heures après l'administration de 2 DMM et 6½ heures après 1 DMM).

Les résultats de ces expériences sont données dans les tableaux V et VI. On constate du tableau V que l'administration répétée de Na_2 EDTA Ca ne peut prévenir la mort des animaux intoxiqués 3 heures auparavant, à l'exception

Tableau IV

Résistance des souris blanches à l'administration répétée du Na_2EDTA Ca

Heures	Quantité de Na_2 EDTA Ca injectée ml sol.	mg	Résultat poursuivi pendant 10 jours Nombre des survivants / Total animaux
10	0,5 cc. sol. 5,0%	25,0	
11	0,5 cc. sol. 2,5%	12,5	
12	0,5 cc. sol. 2,5%	12,5	10/10
13	0,5 cc. sol. 2,5%	12,5	
14	0,5 cc. sol. 2,5%	12,5	
		Total 75 mg. = 3,75 g/kg	

Tableau V

L'effet du traitement chez les souris intoxiquées 3 heures auparavant avec 2 DMM toxine perfringens, obtenu par une ou plusieurs doses répétées de Na_2EDTA Ca

Lot	Quantité de toxine injectée	Na_2EDTA Ca	Nombre des survivants / Total animaux injectés	Temps moyen de survie des animaux aprés l'injection de toxine
1	2 DMM	—	0/20	6 h. 21′ ±1 h. 02′
2	2 DMM	25 mg — 3 heures après l'administration de la toxine	0/20	31 h. 06′ ±8 h. 42′
3	2 DMM	25 mg — 3 heures après l'administration de la toxine, ensuite 12,5 mg par 4 fois à intervalle d'une heure	1/20	22 h. 30′ ±5 h. 24′

d'un seul cas sur 20 testés. De même, on constate que l'administration soit en doses unique, soit en doses répétées de Na_2 EDTA Ca, augmente de manière sensible et égale * le temps de survie des animaux, par rapport aux témoins.

6. De la même manière nous avons également étudié la durée de survie des animaux traités par Na_2 EDTA Ca seulement 6 ½ heures après l'intoxication avec 1 DMM.

Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.

Ainsi qu'il ressort du tableau VI, l'administration du Na_2 EDTA Ca en dose unique ou répétée 6 ½ heures après l'intoxication des souris avec 1 DMM, ne

*) La moyenne en temps de survie paraît être plus réduite chez les animaux traités avec des doses répétées de Na_2 EDTA Ca; il faut pourtant tenir compte du fait que l'animal survivant a été exclu de cette statistique.

Tableau VI

L'effet du traitement chez les souris intoxiquées $6^1/_2$ heures auparavant avec 1 DMM toxine perfringens, obtenu par une ou plusieurs doses répétées de Na_2EDTA Ca

Quantité toxine administrée	Na_2 EDTA Ca	Nombre des survivants / Total animaux injectés	Temps moyen de survie des animaux après l'injection de 1 DMM toxine
1 DMM	—	1/20	13 h. 12′ ±2 h. 15′
1 DMM	25 mg — 6.1/2 heures après l'administration de la toxine	1/20	14 h. 42′ ±3 h. 36′
1 DMM	25 mg — 6.1/2 heures après l'administration de la toxine, ensuite 12,5 mg par 4 fois à intervalle d'une heure.	1/20	16 h. 10′ ±2 h. 15′

modifie pas de manière significative la durée de survie des animaux traités, par rapport aux témoins non-traités. Les différences entre les moyennes des trois lots ne sont pas significatives.

DISCUSSION

La pathogénie des toxi-infections gangréneuses n'est pas encore suffisamment élucidée, surtout en ce qui concerne l'action générale de l'infection et de l'intoxication provoquées par les différents germes de la gangrène. Cette raison a déterminé les auteurs de la dernière édition du manuel classique de TOPLEY et WILSON (5) à écrire: « Outre leur action agressive dans les tissus infectés, nous ignorons en grande mesure le mécanisme d'action des différentes toxines clostridiennes chez l'homme ».

MACFARLANE (6), tout en reconnaissant que l'alpha-toxine peut à elle seule déterminer la mort des souris infectées, — vu que la lécithinase contenue dans 1 DMM suffit pour détruire en 2—3 heures toute la lécithine sanguine — met en doute l'action exclusive de l'alpha-toxine ou des autres exotoxines du *Cl. perfringens ;* en accord avec d'autres auteurs, MACFARLANE émet la théorie de l'origine tissulaire locale de l'intoxication gangréneuse générale (7, 8, 9).

Selon cette théorie, l'action de l'alpha-toxine et des autres composants toxiques appartenant au *Cl. perfringens* produirait une décomposition tissulaire locale du muscle affecté, ce qui ménerait à la résorption de certaines protéines dénaturées, toxiques pour l'organisme.

Les résultats de nos expériences représentent un argument en plus (à côté des arguments exposés dans un travail antérieur) (10) en faveur du rôle de la lécithinase alpha dans l'intoxication gangréneuse, vu le peu de probabilité d'une action de l'agent chélateur sur un autre composant toxique que l'alpha-toxine (l'hypothétique toxine tissulaire non-spécifique). A ce sujet, il paraît significatif que nos expériences confirment en détail, ainsi que nous l'avons montré plus haut, les expériences de MOSKOWITZ, auteur qui a découvert l'action des composants EDTA sur l'alpha-toxine du *Cl. perfringens.*

Ainsi que nous l'avons montré, l'action de l'agent chélateur après l'injection de la toxine n'est utile que pendant une certaine période. « Il semblerait que

l'action de la toxine soit cumulative et que, si son activité est inhibée par l'acide Ca EDTA avant d'atteindre le niveau mortel, les souris peuvent guérir » (MOSKOWITZ) (3).

Le fait qu'à un moment donné (après l'administration de la toxine), aucune dose de Na_2 EDTA Ca ne peut plus sauver l'animal, paraît démontrer que l'action de l'alpha-toxine est irréversible dans l'organisme animal.

D'ailleurs, selon OAKLEY (11) nul traitement institué 6 heures après le développement d'une toxi-infection gangréneuse expérimentale, ne peut sauver l'animal. MACFARLANE (12) a mis en évidence une situation similaire, sur un nombre important de blessés présentant des plaies de guerre avec forte toxémie gangréneuse, traités par du sérum antitoxique.

La vitesse de résorption et la capacité de se fixer de l'alpha-toxine dépend de la quantité de toxine présente au niveau de l'inoculation (le temps de fixage de la dose mortelle irréversible a été de 3 heures après l'administration de 2 DMM, respectivement 6½ heures après 1 DMM). De même, la durée de survie des animaux dépend de la quantité fixée; elle est en moyenne 5 fois plus grande chez les animaux traités après l'inoculation de 2 DMM, que chez les témoins non-traités, même si le médicament est administré à un moment où le traitement est incapable de sauver l'animal.

La survie des animaux qui ont reçu 2 DMM et de l'EDTA 3 heures après a été plus que double (31 heures 20'), par rapport à celle des souris qui ont reçu 1 DMM et n'ont pas été traitées (13 heures). Ce fait pourrait démontrer qu'au moment de l'intervention de l'EDTA (3 heures après l'administration de la toxine) l'entière quantité de toxine, représentée par 1 DMM, n'etait pas encore fixée, et que l'EDTA n'a eu qu'une action de retardement, ne pouvant empêcher le fixage ultérieur de cette quantité. Dans ce cas, la vitesse de l'élimination ou de destruction de la toxine non-fixée dans l'organisme serait inférieure à celle du fixage du reste de la toxine, nécessaire pour compléter 1 DMM.

Une autre explication pourrait être due au fait qu'une DMM avait été fixée à ce moment, l'EDTA retardant seulement l'action de la toxine jusqu'à l'instant où les ions nécessaires ont été libérés des dépôts de l'organisme. Dans ce cas il faudrait admettre que la toxine fixée peut ne pas agir immédiatement sur son substratum spécifique (lécithine).

Si l'administration, même en doses répétées de Na_2 EDTA Ca, est commencée 6. ½ heures après l'intoxication avec 1 DMM ou 3 heures après l'intoxication avec 2 DMM, elle ne peut prolonger la durée de survie des animaux.

Tenant compte des résultats de cette étude, nous sommes passés à l'expérimentation de l'action protectrice du Na_2 EDTA Ca vis-à-vis de l'infection gangréneuse avec le *Cl. perfringens* type A, réalisée dans des conditions aussi proches que possible des conditions naturelles. Les résultats de ces expériences seront exposés dans une communication ultérieure.

RÉSUMÉ

1. L'administration de 25 mg Na_2 EDTA Ca aux souris blanches, peut défendre les animaux en proportion de 100% envers l'action de 2 DMM alpha-toxine-perfringens. Le pouvoir protecteur du Na_2 EDTA Ca diminue proportionnellement au prolongement de l'intervalle écoulé entre l'administration de la toxine

et celle de l'agent chélateur, cessant 3 heures après l'inoculation de 2 DMM respectivement 6½ heures après 1 DMM; après ces intervalles la répétition des doses de l'agent chélateur n'a pas plus d'effets favorables que l'administration d'une dose unique.

2. La vitesse de résorption et de fixage de l'alpha-toxine perfringens, ainsi que la rapidité de l'action léthale augmente proportionnellement à l'augmentation de la dose de toxine. L'administration du Na_2 EDTA Ca 3 heures après 2 DMM toxine, prolonge de manière significative (plus de 5 fois) la vie des animaux, ce qui est dû probablement au fait que l'agent chélateur neutralise une partie de 1 DMM, qui est encore non-fixée au moment respectif.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bittner J., Winter D. et Olaru A. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 467.
2. Moscowitz M. — Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1956, **92**, 706.
3. Moskowitz M., Deverelle M.W. et Mc. Kinney. — Science 1956, **123**, 1077.
4. Moskowitz M. — Nature 1957, **181**, 550.
5. Wilson G.S. et Miles A.A. — "Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity", London, Ed. Arnold, 1955, 1976.
6. Macfarlane M.G. et Knight B.C.J.G. — Biochem. Journ. 1941, **35**, 884.
7. Mac Lennan J.D. et Macfarlane R.G. — Lancet 1944, II, 301.
8. Macfarlane R.G. et Mac Lennan J.D. — Lancet 1945, II, 328.
9. Stammers F.A.R., Mac Lennan J.D., Macfarlane M., Hartley P. et Evans D.G. — Proc. Roy. Soc. Med., 1946, **39**, 291.
10. Bittner J. et Voinesco V. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1960, 1960, **19**, 605.
11. Oakley C.L. — British Med. Bull., 1954, **10**, 52.
12. Macfarlane M.G. — British Med. Journ. 1943, II, 636.

ДЕЙСТВИЕ ЭТИЛЕН-ДИАМИНО-ТЕТРАУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ (ЭДТА) НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИНТОКСИКАЦИЮ И ИНФЕКЦИЮ, ВЫЗВАННЫЕ CL. *PERFRINGENS* ТИПА A

СООБЩЕНИЕ II. ПРЕДОХРАНИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭДТА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНУЮ ИНТОКСИКАЦИЮ, ВЫЗВАННУЮ АЛЬФАТОКСИНОМ *Cl. perfringens*

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение 25 мг Ca ЭДТА Na_2 белым мышам может защитить 100% этих животных от действия 2 ДЛМ альфа-токсина Cl. perfringens.

Защитное действие Ca ЭДТА Na_2 снижается пропорционально удлинению интервала между введением токсина и келанта и оно прекращается спустя 3 часа после введения 2 ДЛМ или спустя 6,5 часов после введения 1 ДЛМ; после этих промежутков времени повторение доз келанта не оказывает лучшего эффекта чем введение 1 дозы.

2. Скорость всасывания и связывания альфа-токсина perfringens а также и скорость смертельного его действия, увеличивается пропорционально увеличению дозы токсина. Введение Ca ЭДТА Na_2 спустя 3 часа после 2 ДЛМ токсина значительно — свыше чем в 5 раз — увеличивает продолжительность жизни животных, повидимому, в результате того, что келант нейтрализует часть 1 ДЛМ остающуюся пока несвязанной.

DIE EINWIRKUNG DER ETHYLENDIAMINOTETRAESSIGSÄURE (EDTA) AUF DIE EXPERIMENTELLE VERGIFTUNG UND INFEKTION MIT *Cl. PERFRINGENS* TYPUS A.

2. *MITTEILUNG* — DIE SCHUTZWIRKUNG DES Ca EDTA Na_2 BEI DER EXPERIMENTELLEN VERGIFTUNG MIT PERFRINGENS α -TOXIN.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Verabreichung von 25 mg CA EDTA NA_2 an weisse Mäuse schützt 100% der Tiere gegen die Wirkung von 2 DLM Perfringens — α -Toxin. Die Schutzwirkung des CA EDTA NA_2 nimmt mit der Zeitspanne zwischen der Verabreichung des Toxins und des chelierenden Agens ab und verschwindet 3 Stunden nach der Verbabreichung von 2 DLM, oder $6^1/_2$ Stunden nach der Verabreichung von 1 DLM vollkommen. Nach Ablauf dieser Zeitspannen, wirkt sich die Wiederholung der Dosen des cheliernden Agens nicht günstiger aus als die Verabreichung einer Einzeldosis.

2. Die Geschwindigkeit der Resorption und Fixierung des *Perfringens*-α -Toxins sowie die Geschwindigkeit seiner tödlichen Wirkung steigen mit der Erhöhung der Toxindosis an. Wird CA EDTA NA_2 3 Stunden nach 2 DLM Toxin verabreicht, so tritt eine bezeichnende, 5fache Verlängerung der Überlebensdauer der Tiere ein, was vermutlich auf die Neutralisierung eines teils des noch nicht fixierten Toxinüberschusses über 1 DLM durch das chelierende Agens zurückzuführen ist.

THE ACTION OF ETHYLENEDIAMINOTETRAACETIC ACID (EDTA) ON EXPERIMENTAL INTOXICATION AND INFECTION WITH *Cl. PERFRINGENS* TYPE A

NOTE II. THE PREVENTIVE ACTION OF Ca EDTA Na_2 IN EXPERIMENTAL INTOXICATION WITH THE α -TOXIN OF *Cl. PERFRINGENS.*

SUMMARY

1. The administration of 25 mg. CA EDTA Na_2 to albino mice will protect 100 per cent of the animals against the action of 2 DLM of the α-toxin of *Cl. perfringens.* The ability of CA EDTA Na_2 to confer protection decreases as the interval elapsed between administration of the toxin and administration of the chelating agent increases. Protection is not exerted any longer at the end of 3 hours after the administration of 2 DLM or of $6^1/_2$ hours after the administration of 1 DLM. After these intervals, repetition of the dose of chelating agent will not yield better results than the administration of a single dose.

2. The rates of resorbtion and fixation of *Cl. perfringens* α -toxin as well as the rapidity of its lethal action increase *pari passu* with the toxin dose. Administration of CA EDTA Na_2 3 hours after 2 DLM of the toxin results in a significant 5fold increase of the survival time of the animals. This is probably due to the neutralization by the chelating agent of part of the supplementary toxin amount exceeding a DLM, which has not yet been fixed in the tissues.

CONTRIBUTION EXPÉRIMENTALE À L'ÉTUDE DE L'EMBRYOGENÈSE ET DE L'INFECTIOSITÉ DES OEUFS *D'ASCARIS LUMBRICOIDES* DANS L'EAU

par

ANGELA SORESCO et D. PANAITESCO

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Section de Parasitologie Médicale)

— Manuscrit reçu le 3 février 1961 —

Divers auteurs ont mentionné à partir de la seconde moitié du XIX-e siècle le rôle des réservoirs d'eau dans l'extension de l'ascaridiose. Parmi ceux-ci, CHANDLER, précise pour l'Inde (1925—1928), que le facteur principal de la dissémination de l'ascaridiose dans ce pays est l'eau polluée des puits et des bassins creusés dans la terre et BERROWS (1945) affirme que l'incidence élevée de l'ascaridiose parmi la population de la Nouvelle Guinée Hollandaise (86,8%) serait due autant à la pollution intense de l'eau et du sol, qu'à la consommation de l'eau des rivières ou des puits non-aménagés.

Ces auteurs, ainsi que la majorité des autres chercheurs étrangers, en montrant le rôle du facteur hydrique dans la dissémination de l'ascaridiose, comme dans les autres helminthiases, s'appuient seulement sur des observations épidémiologiques indirectes, sans confirmer leur hypothèse par le décèlement des œufs d'helminthes dans les réservoirs d'eau (VASILKOVA-GHEFTER, 1958).

La viabilité des œufs d'ascarides et des autres helminthes dans les eaux des rivières a été démontrée dans l'U.R.S.S. par toute une série d'auteurs (GHEFTER, KRASOVSKAIA, SAGURINA, VASILKOVA, ORLOVA, VISINEVSKAIA, DOBROVA, ALF, PRAVDINA, USACIOVA) qui, par des recherches systèmatiques, ont montré que l'eau des rivières et des réservoirs d'eau peut être polluée par des œufs d'ascarides ou d'autres helminthes et qu'on observe une pollution considérable des réservoirs naturels d'eau en particulier dans les régions où l'incidence de l'ascaridiose est élevée au sein de la population. Des faits semblables ont été également signalés plus tard en Roumanie, par LUPASCO et coll. (1959).

Malgré ces données, le rôle du facteur hydrique dans l'épidémiologie de l'ascaridiose est encore insuffisamment étudié.

VASILKOVA et GHEFTER ont signalé la prédominance marquée des œufs d'*Ascaris* non-mûrs dans les échantillons d'eau examinés et ont été portés à supposer qu'en général, la dissémination en masse de l'ascaridiose ne peut avoir lieu directement par l'eau.

GHEFTER (1949) a montré que, dans l'eau, l'évolution embryonnaire des œufs est lente et qu'elle ne se produit qu'en présence de certaines concentrations de 0_2 (10—11 mg/litre d'eau). VASILKOVA et GHEFTER soutiennent que,

dans les conditions de l'expérience, les œufs embryonnés (avec larves vivantes) conservent leur viabilité dans les eaux pures pendant une année, tandis que dans les réservoirs avec des eaux polluées cette viabilité n'est que de 1 à 3 mois.

En Roumanie, SORESCO et PANAITESCO (1952) ont démontré expérimentalement la possibilité de l'évolution des œufs d'*Ascaris lumbricoides* dans l'eau et en 1958, les mêmes auteurs, en collaboration avec C. CIUREA, ont prouvé que dans certaines conditions expérimentales (évolution embryonnaire influencée par un stimulus biochimique, réalisé par le formol et le froid (méthode MÎRZA, UNGUREANU et BOLDESCO, 1913), l'embryogenèse des œufs d'*Ascaris* est possible à 20°C dans des milieux liquides, même en présence d'une concentration plus réduite d'oxygène (4,5 — 0,09 mg/litre). Dans ces conditions, l'embryogenèse des œufs se développe lentement, dans un intervalle de temps qui augmente en rapport direct avec la diminution de la concentration en oxygène du milieu, sans entraîner par cela une modification du pouvoir infestant des œufs ainsi embryonnés.

Ces données expérimentales ont été pratiquement confirmées par LUPASCO, SORESCO et PANAITESCO (1959), qui ont démontré la possibilité d'une évolution embryonnaire lente, avec conservation de longue durée du pouvoir infestant des œufs d'*Ascaris lumbricoides* en conditions d'anaérobiose, conditions offertes par la boue des bassins de décantage de l'eau utilisée à l'irrigation des cultures potagères.

Etant donné que les problèmes concernant la concentration de la viabilité des œufs d'*Ascaris* dans les réservoirs d'eau (VASILKOVA, 1950), ainsi que l'*important problème de la conservation du pouvoir infestant de ces oeufs*, n'ont pas trouvé leur solution jusqu'a présent, nous avons estimé nécessaire d'entreprendre une série de recherches expérimentales dans ce domaine, afin de compléter nos travaux antérieurs sur la possibilité du développement embryonnaire et de viabilité offerts aux œufs d'*Ascaris* par le milieu ambiant.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans ce but, de même que dans nos travaux antérieurs, nous avons utilisé des œufs d'*Ascaris lumbricoides*, récoltés de manière stérile directement de l'utérus d'une femelle d'*Ascaris*, œufs que nous avons introduits dans des flacons de 50 ml à bouchon rôdé, contenant du sérum physiologique, de la solution Ringer ou de l'eau pure, et conservés à la température de la chambre (variant entre 18—24°C).

A intervalles réguliers (3—5 jours) nous avons contrôlé ces cultures, en prélevant de petits fragments d'utérus chargés d'œufs, que nous avons examinés au microscope dans le but de préciser les étapes du développement embryonnaire et nous avons constaté (ainsi qu'on peut voir du tableau I) que, dans ces conditions, le développement complet se fait en moyenne en 28—30 jours. Ce fait confirme nos recherches antérieures (1952), par lesquelles nous avions constaté que dans l'eau infectée expérimentalement au laboratoire et maintenue en conditions normales, l'évolution des œufs d'*Ascaris lumbricoides* est en moyenne d'environ 34 jours, pendant la période de printemps et d'été.

Nous indiquons à titre d'observation particulière que, dans ce cas, ainsi que dans nos recherches antérieures, le développement embryonnaire est

Tableau I

Etapes de développement des oeufs d'A. lumbricoides

Milieu	Température °C	Date de l'infection	Contrôle							Contrôle. Vérification du pouvoir infectant. 4 cobayes	Témoins
			5-e jour	10-e jour	16-e jour	20-e jour	28-e jour	30-e jour	50-e jour		
			23 oct. 58	28 oct. 58	3 nov. 58	7 nov. 58	15 nov. 58	17 nov. 58	5 janv. 59		
Eau	20°	18.oct.1958	bl.	bl.	m.	m.	pl.	l.v.	l.v.	Pneumonie ascaridienne, réactivité pulmonaire intense chez 4 cobayes.	1
Sérum physiologique	20°	18.oct.1958	bl.	bl.	m.	m.	pl.	l.v.	l.v.	Pneumonie ascaridienne, réactivité pulmonaire intense chez 4 cobayes.	1
Solution Ringer	20°	18.oct.1958	bl.	bl.	m.	pl.	l.v.	l.v.	l.v.	Pneumonie ascaridienne, réactivité pulmonaire intense chez 4 cobayes.	1

Légende: bl. = blastules
m. = morules
pl. = planules
l.v. = larves vivantes

légèrement accéléré dans la solution Ringer, par rapport au développement des œufs introduits dans l'eau ou dans du sérum physiologique.

Les œufs d'*Ascaris lumbricoides*, qui ont atteint le stade d'évolution complète (larve vivante à l'intérieur), ont été maintenus dans les mêmes conditions pendant encore 50 jours (à partir de la date de l'apparition de la larve dans l'œuf), afin d'assurer la maturation complète de la larve. Par la suite, on a infecté les animaux de laboratoire (cobayes), selon les techniques employées antérieurement *), afin d'étudier leur pouvoir infestant.

Dans tous ces cas les animaux infectés ont fait une pneumonie ascaridienne, prouvant ainsi le pouvoir infestant des œufs d'*Ascaris* évolués dans l'eau.

Pour chaque série de culture on a infecté quatre animaux, en ajoutant chaque fois un animal témoin.

Ces faits nous ont permis de préciser avec une plus grande exactitude que les œufs d'*Ascaris lumbricoides* peuvent accomplir leur évolution embryonnaire dans l'eau, à une température de 20°C, dans un intervalle de 28—30 jours, durée plus longue que celle nécessaire au développement des mêmes œufs, dans des conditions similaires de température, dans le sol (18 jours).

Afin d'élucider le second problème que nous nous sommes proposé dans le cadre de ces recherches: la durée pendant laquelle les œufs d'*Ascaris lumbricoides*, évolués dans l'eau à une température plus ou moins constante et maintenus ensuite dans les mêmes conditions, conservent leur viabilité, nous avons entrepris une seconde série de recherches.

Continuant à maintenir au laboratoire, dans les mêmes conditions, les œufs évolués dans l'eau, nous avons cherché à vérifier leur viabilité à de plus longs intervalles, par le contrôle du mouvement des larves, après l'éclosion, réalisée entre lame et lamelle, dans du sérum physiologique, par pression sur lamelle (Timosin, 1956). Ce contrôle a été complété chaque fois par l'inoculation d'un lot d'œufs d'*Ascaris lumbricoides* aux cobayes, afin de vérifier la persistance du pouvoir infectant.

A l'occasion des dernières recherches, nous avons ajouté au contrôle de la viabilité des œufs avant leur inoculation aux animaux aussi la méthode de la coloration vitale à l'eosine.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont concrétisés dans le tableau II et le graphique 1.

Des données du tableau II et du graphique 1, il ressort:

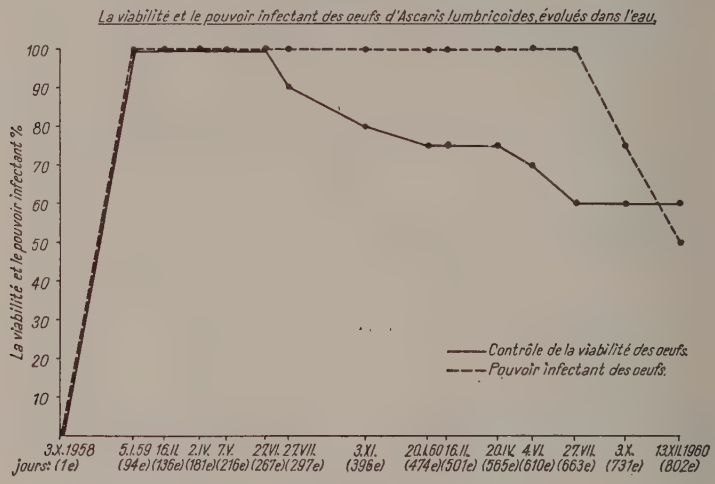
En premier lieu, les oeufs d'*Ascaris lumbricoides*, maintenus dans de l'eau pure à la température de la chambre (variant entre 18—24°C), conservent leur viabi-

*) On administrait aux cobayes de 300—350 g, maintenus à jeun pendant 24 heures, par voie orale à l'aide d'une pipette, en une seule prise, un certain nombre de gouttes d'une émulsion d'oeufs embryonnés, dont la concentration par goutte était contrôlée au microscope et calculée de telle manière que le nombre d'oeufs embryonnés administrés soit d'environ 2000. L'animal était tenu sous observation, en contrôlant la température, le nombre de respirations par minute et l'état général, pendant 10—12 jours. De règle, on a constaté qu'à partir du 5—6-e jour de l'infection, les animaux refusaient la nourriture, présentaient un état d'apathie, hérissement des poils, respiration accélérée (180—200 par minute) et tendance à l'hypothermie vers le 8—9e jour. Les animaux meurent le 10—11e jour, à partir de l'infection; à l'examen anatomo-pathologique on constate de zones congestives dans le foie et le poumon, es section effectuées de ces zones mettant en évidence des larves d'*Ascaris*.

Viabilité et le pouvoir infectant des oeufs d'A. lumbricoide, évolués dans l'eau *Tableau II*

No. du contrôle	Date du contrôle	Nombre de jours: à partir de l'apparition de la larve dans l'oeuf	Nombre de jours: après le commencement de l'expérience.	Résultat du contrôle entre lame et lamelle — larves vivantes, mobiles %	Oeufs non-colorés á l'éosine %	Inoculations des animaux: Nombre des animaux inoculés	Nombre témoins	Quantité inoculée	Date de l'apparition des phénomènes pulmonaires	Date du decès	Gravité de la réactivité pulmonaire	Nombre des animaux survivants
1	5.I.1959	66	94	100%	—	4	1	2000 œufs pour chaque animal	8-e jour	10—11 jour	III et IV	—
2	16.II.1959	108	136	100	—	4	1	»	8—9-e jour	10—11-e jour	III et IV	—
3	2.IV.1959	153	181	100	—	4	1	»	8-e jour	10—12-e jour	IV	—
4	7.V.1959	188	216	100	—	4	1	»	8—9-e jour	10—11-e jour	III et IV	—
5	27.VI.1959	239	267	100	—	5	1	»	8—9-e jour	10—11-e jour	III et IV	—
6	27.VIII.1959	269	297	90	—	4	1	»	8—9-e jour	10—11-e jour	IV	—
7	3.XI.1959	368	396	80	—	4	1	»	8—9-e jour	10—11-e jour	III et IV	—
8	20.I.1960	446	474	70—80	—	4	1	»	9-e jour	10—12-e jour	IV	—
9	16.II.1960	473	501	70—80	—	5	1	»	9-e jour	10—12-e jour	IV	—
10	20.IV.1960	537	565	70—80	25	4	1	»	9-e jour	10—12-e jour	III et IV	—
11	4.VI.1960	582	610	70	30	4	1	»	9-e jour	10—12-e jour	IV	—
12	27.VII.1960	635	663	60	40	4	1	»	5-e jour	7—12-e jour	IV	—
13	3.X.1960	703	731	60	40	4	1		6-e jour	8—10-e jour	IV	1
14	13.XII.1960	774	802	60	40	4	1		10-e jour	20—31-e jour	IV	2

lité et leur pouvoir infectant (vérifié sur animaux) pendant plus de deux années (802 jours); après ce long intervalle, les œufs administrés aux cobayes produisent la pneumonie ascaridienne (cycle migrateur des larves), dans des conditions semblables à celles des œufs récemment embryonnés.



Graphique 1

En second lieu, les larves des œufs d'*Ascaris lumbricoides*, maintenus dans ces conditions, semblent présenter une période de stagnation dans leur activité, dans le sens que les larves des œufs examinés à chaque contrôle et en particulier aux deux derniers contrôles, étaient immobiles, par différence des premiers contrôles, où les larves disposaient d'une vive mobilité dans l'œuf.

Le réchauffement de la lame sur laquelle se trouvaient des œufs avec des larves immobiles, prélevés à l'occasion des contrôles effectués à longs intervalles (446, 473, 537 jours après l'embryonnement), permettait aux larves de recouvrer leur mobilité.

De même, l'éclosion artificielle des larves par pression, leur non-coloration à l'éosine ainsi que le test de l'infection des animaux, ont démontré la viabilité des larves des œufs prélevés des cultures à ces longs intervalles.

En troisième lieu, on remarque le fait que les larves ont conservé leur capacité complète d'infestation pendant 663 jours et qu'après cette période le pouvoir infectant baisse, dans le sens qu'aux deux dernières infections, les animaux ont survécu en proportion de 25 à 50%. L'observation prolongée des animaux survivants a montré, qu'en moyenne, ils sont morts 3 mois après l'invasion ascaridienne et qu'ils présentaient des lésions pulmonaires caractéristiques à l'invasion, fait qui démontre que chez ces animaux aussi les larves d'*Ascaris* ont réalisé un cycle migrateur, prouvant l'infectiosité des œufs.

En quatrième lieu, on remarque qu'aux premiers contrôles entre lame et lamelles, les larves éclosées artificiellement par pression étaient vivantes en

proportion de 100%, tandis qu'aux derniers, la proportion des larves vivantes mobiles n'était plus que de 80—60%.

Par les recherches expérimentales effectuées jusqu'à présent nous avons pu préciser que, en dehors de la possibilité du développement de l'embryogenèse dans l'eau, les œufs d'*Ascaris lumbricoides*, évolués dans ces conditions, peuvent conserver leur viabilité et leur pouvoir infectant pendant une longue période — dépassant deux ans, — à partir de l'apparition de la larve dans l'œuf.

Ces observations expérimentales prouvent que l'eau ne joue pas simplement le rôle de véhicule des œufs de ce géohelminthe, mais que, dans les conditions indiquées, elle peut constituer, presque de même que le sol, un milieu favorable à l'embryogenèse et à la conservation des œufs d'*Ascaris*, ayant donc, dans l'épidémiologie de cette maladie, un rôle presque tout aussi important.

Par conséquent, nous estimons que les notions classiques de l'épidémiologie de cette maladie devront être reconsidérées et complétées en ajoutant l'élément hydrique parmi les facteurs de propagation de l'ascaridiose; ce fait représente la démonstration des plus grandes possibilités que le milieu ambiant peut offrir à la transmission de cette maladie, élargissant ainsi son cadre épidémiologique.

RÉSUMÉ

Les auteurs montrent que dans des conditions expérimentales les œufs d'*Ascaris lumbricoides* évolués dans l'eau, à la température de 18—24°C, ont conservé leur viabilité et leur pouvoir infectant, faits vérifiés sur les animaux de laboratoire pendant plus de deux ans (802 jours).

Par ces expériences les auteurs prouvent également que l'eau ne joue pas le simple rôle de véhicule des œufs de ce géohelminthe, mais qu'elle peut constituer, presque de même que le sol, un milieu favorable à l'embryogenèse et à la conservation de la viabilité des œufs infectants, démontrant ainsi les larges possibilités offertes par le milieu ambiant à la propagation de l'ascaridiose.

BIBLIOGRAPHIE

1. Alf L.S. — « Sbornic naucinîh trudov » Moscova, 1949, 136—152.
2. Lupasco Gh., Soresco A. et Panaitesco D. — Microbiol., Parazitol., Epidemiol., 1960, no. 1, 3.
3. Lupaşco Gh., Soresco A., Panaitesco D., Angelesco C., Hacig A. et Solomon P. — — Travaux de la V-e Ses. scient. I.M.F. 1957 Bucarest.
4. Mîrza D.D., Ungureanu E. et Boldesco I. — Bul. St. Acad. R.P.R., Seria Medicină, 1953, **5**, 421.
5. Nitzulesco V., Soresco A. et Panaitesco. — Studii şi Cercet. Inframicrob., Microb. Parazit., 1956, nr. 3—4, 553.
6. Podiapolskaia V. P. et Kapustin F.V. — « Glistnîe bolezni celoveca », Medghiz Moscova, 1958.
7. Pravdina D.L. — Med. Parazitologhiia, 1950, nr. 2, 161.
8. Soresco A. et Panaitesco D. — Rev. Ig. Microbiol. Epidemiol., 1952, No. 3, 33.
9. Soresco A. et Panaitesco D. — Arch. Roum. de Path. Exp. et de Microbiologie, 1957, **16**, 415.
10. Soresco A., Panaitescu D. et Ciurea C. — Sixth Intern. Congress on Trop. Med. and Malaria, Lisbon, Sept., 1958, Abstracts of the Papers, 281.
11. Spindler L.A. — Amerc. J. Hyg., 1929, **10**, 476.
12. Timosin G.D. — Mediţinskaia Parazitologhiia, 1956, nr. 3, 239.

13. Uscaciova A. M.. — Ghighiena i Sanitaria, 1951, no. 12, 25.
14. Vasilkova Z.G. — Metodî Ghelmintologhiaskih isledovania Medghiz, Moscova, 1955.
15. Vasilkova Z.G., Ghefter V. A. — An. Rom. Sov. Seria Ig. şi Org. Sanit., 1953, 7, 7.
16. Vasilkova Z.G. — Mediţinsk. Parazitol. i Parazit. bolezni, 1953, no. 5, 444.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ НАБЛЮДЕНИЯ ПО ВОПРОСУ ЗАРОДЫШЕВОГО РАЗВИТИЯ И ИНФЕКЦИОННОСТИ ЯИЦ *ASCARIS LUMBRICOIDES* В ВОДЕ.

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы показали, что в экспериментальных условиях, развившиеся в воде при температуре 18—24°С яйца *Ascaris lumbricoides* сохраняют свою жизнеспособность и инфекционные свойства в течение свыше 2-х лет — 802 дня — что было проверено на лабораторных животных.

Этим путем авторы доказали, что вода не играет роль только простого переносчика яиц этого геогельминта, а может представлять собою, почти так же как и почва, благоприятную среду для эмбриогенеза и сохранения жизнеспособности яиц, обладающих инфицирующими свойствами, доказав также и большие возможности, представленные окружающей нас средой для распространения аскаридиоза.

EXPERIMENTALLE BEITRÄGE ZUM STUDIUM DER EMBRYONALEN ENTWICKLUNG UND DER INFEKTIOSTÄT DER EIER VON *ASCARIS LUMBRICOIDES* IM WASSER.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser weisen nach, dass Eier von *Ascaris lumbricoides*, die sich im Wasser bei einer Temperatur von 18°—24°C entwickeln, ihre Lebensfähigkeit und an Laboratoriumstieren nachgeprüfte Infektionsfähigkeit während einer Zeitspanne von über 2 Jahren = 802 Tagen bewahren.

Dadurch ist erwiesen, dass Wasser nicht einfach die Rolle eiens Fortbeforderungsmittels dieser Geohelmintheneier spielt, sondern fast ebenso wie der Boden ein günstiges Milieu für die Embryogenese und Bewahrung der Lebensfähigkeit dieser infizierenden Eier darstellt, woraus sich die grossen Möglichkeiten ergeben, die die Umwelt für die Verbreitung der Askaridiose bietet.

EXPERIMENTAL CONTRIBUTIONS TO A STUDY CONCERNING THE EMBRYONAL DEVELOPMENT AND INFECTIOUSNESS OF *ASCARIS LUMBRICOIDES* EGGS IN WATER

SUMMARY

The authours have shown that in experimental conditions eggs of *Ascaris lumbricoides* developing in water at the temparature of 18—24°C maintain their viability and infectious potency (as tested in laboratory animals) for a period of over 2 years, i.e. 802 days.

Thus, the authors have proved that water is not merely a carrier of the eggs of this geohelminth but may afford, almost to the same extent as soil, a favourable environment for the embroyogenesis and maintenance of viability of infectious eggs. This is further evidence of the great possibilities offered by the environment for the spread of ascaridiosis.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'ANTIBIOSE « IN VITRO » DES SOUCHES LOCALES DE *NEISSERIA MENINGITIDIS* ET D'AUTRES *NEISSERIA*

par

AURICA TOPCIU et ELVIRA POPESCO

(Travail de l'Institut « Dr. Cantacuzino » — Service des Cocci pathogènes).

— Manuscrit reçu le 30 juillet 1960 —

Bien que l'incidence des infections méningococciques n'ait pas augmenté ces dernières années et que la mortalité ait énormément diminué, on rencontre néanmoins, en clinique, des cas qui posent des problèmes de thérapeutique. Cependant, les hôpitaux de maladies contagieuses ont hospitalisé, ces derniers temps, un plus grand nombre de méningites dues à *d'autres Neisseria (flavus, crassus*, etc.) que le méningocoque (10).

Tenant compte de ces considérations, nous avons trouvé utile d'étudier « in vitro » la sensibilité des souches isolées pendant les années 1954—1960, vis-à-vis des antibiotiques de base, ainsi que pour une partie d'antibiotiques de réserve.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a étudié 48 souches de méningocoques et 17 souches d'autres *Neisseria (crassus, flavus* I, II, III, *flavescens)*, comme suit:

— la majorité des souches a été isolée des cas d'enfants souffrant de méningite méningococcique, internés à la clinique des maladies contagieuses, Section pour enfants de l'Hôpital d'État No. 1 (Colentina — Bucarest);

— quatre souches isolées dans différents hôpitaux de province (Iassy, Cîmpina, Bacău et Tulcea);

— trois souches isolées du rhino-pharynx de porteurs provenant des foyers à infections méningocociques;

— neuf souches standard de collection.

La provenance des 65 souches étudiées est indiquée dans le tableau I.

Les 48 souches de méningocoque appartiennent aux groupes sérologiques suivants:

Groupe A	= 22 souches
Groupe B	= 12 souches
Groupe C	= 3 souches
Non typables	= 11 souches

Tableau I

Provenance des souches étudiées

Origine	Produit pathologique	Nombre souches de méningocoque	Nombre souches d'autres Neisseria
Malades	Liquide céphalo-rachidien	34	7
	Sang	2	—
Porteurs	Exsudat rhino-pharyngien	3	10
Souches standard de collection		9	—
Total		48	17

Les 17 souches de *Neisseria* ont été identifiées:

Neisseria flavus I 2 souches
Neisseria flavus II 2 souches
Neisseria flavus III 9 souches
Neisseria flavescens 2 souches
Neisseria crassus 2 souches

Dans le présent travail, nous avons étudié la sensibilité des 65 souches de *Neisseria* vis-à-vis de 8 antibiotiques séparément et de 7 antibiotiques associés. Les 8 antibiotiques testés: sulfathiazol, pénicilline, érythromycine, streptomycine chloramphénicol (chloromycétine) chlorotetracycline (auréomycine, oxytétracycline), terramycine, tétracycline (hostacycline).

Les méthodes pour déterminer la sensibilité des germes ont été les suivantes:

1. Méthode diffusimétrique < *a)* technique de Balş et coll. *b)* disques en papier filtre impregnés d'antibiotique.
2. Méthode des dilutions sériées en milieu liquide.

1. *Méthode diffusimétrique* a) *Méthode de Balş et coll.* Cette méthode a été effectuée en incorporant les antibiotiques respectifs dans l'amidon stérilisé par chaleur sèche selon la concentration et les indications des auteurs (1).

b) *Méthode des disques en papier filtre imprégnés d'antibiotiques*:

Nous avons employé des disques en papier filtre de 6,5 mm diamètre, imprégnés avec des dilutions d'antibiotiques similaires aux concentrations obtenues dans le sang et le L.C.R. des malades, dans la thérapie usuelle:

1. sulfathiazol en dilution de 10.000 γ — 2000 γ/ml
2. pénicilline 10 U — 0,1 U/ml
3. érythromycine 50 γ — 0.5 γ/ml
4. streptomycine 60 γ — 3 γ/ml
5. chloromycétine 50 γ — 5 γ/ml
6. auréomycine 10 γ — 1 γ/ml
7. terramycine 10 γ — 0,5 γ/ml
8. hostacycline 10 γ — 0,5 γ/ml

Pour la méthode diffusimétrique, nous avons utilisé un milieu gélosé, avec macéré de viande peptoné 1% et glucosé 0,2% avec sang défibriné de mouton (en proportion de 20%). Pour 25 souches on a testé comparativement la sensibilité au sulfathiazol sur milieu Chabert (gélose sans peptone glucosée+sang laqué de cheval 10%). Étant donné que le milieu Chabert ne présentait aucun avantage sur le milieu gélosé — sang défibriné de mouton, se montrant tout aussi indiqué que le sang laqué de cheval en ce qui concerne l'action antisulfamidique et qu'il est plus accessible pour le laboratoire, nos recherches ont été poursuivies sur ce dernier milieu.

La lecture des résultats a été effectuée après 24 heures à 37°C pour la majorité des souches et 48 heures pour les souches à développement lent; ces dernières étaient incubées dans une atmosphère de bioxyde de charbon 5%.

Le degré de la résistance a été établi en fonction du diamètre de la zone d'inhibition (mesurée à l'aide d'une règle graduée) en notant les résultats en millimètres ainsi:

souches résistantes: 0—10 mm
souches peu sensibles: 10—15 mm
souches sensibles: 15—25 mm
souches très sensibles — au dessus de 25 mm.

2. *Méthode des dilutions sériées en milieu liquide.* Pour cette méthode, on a employé comme milieu de culture le bouillon glucosé (0,2%) ascite (3/4 bouillon pour 1/4 ascite). Les dilutions étaient effectuées à partir de la concentration maximum thérapeutique d'antibiotique obtenue dans le sang jusqu'à la concentration minimum du L.C.R. Pour apprécier l'effet bactériostatique et bactéricide, on a pratiqué des passages de tous les tubes d'essai restés limpides, sur boîtes Petri avec gélose-sang, qui ont été incubées 48 heures à 37°C.

L'absence de croissance des colonies indiquait une bactéricidie et leur développement (contrôlé au microscope) une bactériostase.

Après le test de la sensibilité, effectué séparément, nous avons contrôlé à l'aide de deux méthodes diffusimétriques, la sensibilité des souches aux sept associations d'antibiotiques couramment utilisées en clinique dans les infections neisseriennes.

Les associations testées représentaient les dilutions d'antibiotiques de la concentration minimum thérapeutique du niveau du liquide céphalo-rachidien, ainsi que:

1. sulfathiazol 2000 γ/ml + pénicilline 0,5 U./ml
2. sulfathiazol 2000 γ/ml + érythromycine 0,5 γ/ml
3. sulfathiazol 2000 γ/ml + streptomycine 3 γ/ml
4. sulfathiazol 2000 γ/ml + chloromycétine 5 γ/ml
5. sulfathiazol 2000 γ/ml + auréomycine 1 γ/ml
6. sulfathiazol 2000 γ/ml + terramycine 0,5 γ/ml
7. sulfathiazol 2000 γ/ml + hostacycline 0,5 γ/ml

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de nos recherches ont été concordantes par les deux méthodes diffusimétriques: la méthode de Bals et coll. et la méthode des disques en papier-filtre imprégnés. La dynamique de la sensibilité et de la résistance des souches étudiées par la méthode des disques sont indiquées dans le tableau II.

Il résulte de ce tableau que l'efficience des antibiotiques vis-à-vis du méningocoque « in vitro » est plus grande à la concentration thérapeutique obtenue

Tableau II

Dynamique de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques etudiés

Antibiotique/ml	Résistantes 0-- 10 ml				Modérément sensibles 10—15				Sensibles 15—25 ml				Fortement sensibles, dépassant 25 ml.			
	Méningocoque Nombre souches	%	Autres Neisseria Nombre souches	%	Méningocoque Nombre souches	%	Autres Neisseria Nombre souches	%	Méningocoque Nombre souches	%	Autres Neisseria Nombre souches	%	Méningocoque Nombre souches	%	Autres Neisseria Nombre souches	%
1. Sulfathiazol 10.000 γ	2	4,1	2	11,7	3	6,2	3	17,6	3	6,2	9	53,0	34	70,8	9	53,0
2. Sulfathiazol 8.000 γ	3	6,2	3	17,6	9	18,7	3	17,6	25	52,0	6	34,7	11	22,9	5	29,4
3. Sulfathiazol 2.000 γ	5	10,4	3	17,6	24	50	5	29,9	16	33,3	8	47,1	3	6,2	1	5,8
4. Pénicilline 10 U.	14	29,2	11	64,7	23	47,9	3	17,6	9	18,7	2	11,7	2	4,1	1	5,8
5. Pénicilline 5 U.	24	50,0	12	71,2	22	45,8	4	29,5	2	4,1	—	—	—	—	1	5,8
6. Pénicilline 1 U.	41	85,4	13	76,2	5	10,4	3	17,6	2	4,1	1	5,8	—	—	—	—
7. Pénicilline 0,1 U.	44	91,6	15	88,7	4	8,3	2	11,7	—	—	—	—	—	—	—	—
8. Erythromycine 50 γ	3	6,2	5	29,4	30	62,5	6	34,7	14	29,2	6	34,7	1	2,0	—	—
9. Erythromycine 10 γ	12	25,0	9	53,0	32	66,6	8	47,1	4	8,3	—	—	1	2,0	—	—
10. Erythromycine 5 γ	33	68,7	13	76,2	15	31,2	4	23,5	—	—	—	—	—	—	—	—
11. Erythromycine 1 γ	46	95,8	15	88,2	2	4,1	2	4,7	—	—	—	—	—	—	—	—
12. Erythromycine 0,5 γ	47	97,9	16	94,5	1	2,0	1	5,8	—	—	—	—	—	—	—	—
13. Streptomycine 60 γ	14	29,2	10	58,8	22	45,8	6	34,7	10	20,8	1	5,8	2	4,1	—	—
14. Streptomycine 30 γ	26	54,1	11	64,4	20	41,6	6	34,7	2	4,1	—	—	—	—	—	—
15. Streptomycine 12 γ	41	85,4	15	88,2	7	14,6	2	11,7	—	—	—	—	—	—	—	—
16. Streptomycine 6 γ	48	100,0	16	94,5	—	—	1	5,8	—	—	—	—	—	—	—	—
17. Streptomycine 3 γ	48	100,0	17	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18. Chloromycétine 50 γ	30	62,5	10	58,8	16	33,3	7	41,2	2	4,1	—	—	—	—	—	—
19. Chloromycétine 15 γ	39	81,3	14	82,3	9	18,7	3	17,6	—	—	—	—	—	—	—	—
20. Chloromycétine 5 γ	47	97,9	16	94,5	1	2,0	1	5,8	—	—	—	—	—	—	—	—
21. Auréomycine 15 γ	38	79,1	14	82,3	10	20,8	3	17,7	—	—	—	—	—	—	—	—
22. Auréomycine 5 γ	42	87,5	15	88,2	6	12,3	2	11,7	—	—	—	—	—	—	—	—
23. Auréomycine 1 γ	47	97,9	15	88,2	1	2,0	2	11,7	—	—	—	—	—	—	—	—
24. Terramycine 10 γ	7	14,5	7	41,2	40	83,3	9	53,0	1	2,0	1	5,8	—	—	—	—
25. Terramycine 5 γ	41	85,4	15	88,2	6	12,3	2	11,7	1	2,0	—	—	—	—	—	—
26. Terramycine 1 γ	42	87,5	15	88,2	6	12,3	2	11,7	—	—	—	—	—	—	—	—
27. Terramycine 0,5 γ	48	100,0	17	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
28. Hostacycline 10 γ	30	62,5	11	64,6	18	37,5	6	34,7	—	—	—	—	—	—	—	—
29. Hostacycline 5 γ	42	87,5	16	94,5	6	12,3	1	5,8	—	—	—	—	—	—	—	—
30. Hostacycline 1 γ	47	97,9	16	94,5	1	2,0	1	5,8	—	—	—	—	—	—	—	—
31. Hostacycline 0,5 γ	48	100,0	17	100,0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

dans le sang (pourcentage plus petit de souches résistantes) que dans celle du liquide céphalo-rachidien.

Ainsi, par ordre d'efficience nous observons selon les données du tableau III:

Tableau III

Efficience des antibiotiques vis-à-vis des méningocoques à la conc. du sang et du LCR

Antibiotiques	Souches résistantes % à la concentration du sang	Souches résistantes % à la concentration du L.C·R
1. sulfathiazol	4,1	6,2
2. érythromycine	6,2	97,9
3. terramycine	14,5	100
4. pénicilline	29,1	85,4
5. streptomycine	29,1	100
6. hostacycline	32,5	100
7. chloromycetine	62,5	97,9
8. auréomycine	79,1	97,9

En ce qui concerne le *sulfathiazol* qui diffuse facilement du sang dans le L.C.R. où il atteint presque le même niveau — nous trouvons « in vitro » environ la même efficience à la concentration du sang (4,1% souches résistantes) qu'à celle du L.C.R. (6,2% souches résistantes).

L'*érythromycine*, bien qu'efficiente « in vitro », à la concentration du sang (seulement 6,2% souches résistantes) est pratiquement inactive dans le LCR, parcequ'elle diffuse difficilement du sang par la barrière méningéale; modifiée ainsi « in vitro » nous trouvons 97,9% souches résistantes à la concentration du L.C.R.

La *pénicilline* diffuse bien par les méninges, mais à la concentration de 1 U /ml L.C.R. (représentant 1/10 de la concentration du sang obtenue une demi-heure après une injection intramusculaire de 300.000 U pénicilline cristalline), nous avons trouvé « in vitro » 85,4% souches résistantes tandis qu'à la concentration du sang seulement 29,1%.

Parmi les tetracyclines, la *terramycine* s'est montrée plus active à la concentration du sang (14,5% souches résistantes), tandis qu'à la concentration du L.C.R. elle est complètement inactive.

Tableau IV

Efficience des antibiotiques vis-à-vis des autres Neisseria à la conc. du sang et du LCR

Antibiotiques	Souches résistantes % à la concentration du sang	Souches résistantes % à la concentration du L.C.R
1. sulfathiazol	11,7	17,6
2. érythromycine	29,4	94,5
3. terramycine	41,1	100
4. streptomycine	58,8	100
5. chloromycétine	58,8	94,5
6. pénicilline	64,7	88,2
7. hostacycline	64,7	100
8. auréomycine	82,3	88,2

Tableau V

Dynamique de la sensibilité et de la résistance des souches aux antibiotiques associés

Antibiotiques associés/ml	Résistantes 0—10 ml		Modérément sensibles 10—15 ml		Sensibles 15—25 ml		Fortement sensibles, dépassant 25 ml.	
	Méningocoque Nombre % souches	Autres Neisseria Nombre % souches	Méningocoque Nombre % souches	Autres Neisseria Nombre % souches	Méningocoque Nombre % souches	Autres Neisseria Nombre % souches	Méningocoque Nombre % souches	Autres Neisseria Nombre % souches
1. Sulfathiazol 2000 γ + Pénicilline 0,5 γ	4 8,3	4 23,5	17 35,4	3 17,6	24 50,0	8 47,1	3 6,2	2 11,7
2. Sulfathiazol " + Erythromycine 0,5 γ	4 8,3	4 23,5	22 45,8	6 35,2	20 41,6	7 41,2	2 11,1	— —
3. Sulfathiazol " + Streptomycine 3,0 γ	2 4,1	3 17,6	24 50,0	5 29,4	16 33,3	7 41,2	6 12,4	2 11,7
4. Sulfathiazol " + Chloromycétine 5,0 γ	6 12,3	4 23,5	18 37,5	7 41,2	19 39,5	4 23,5	5 10,4	2 11,7
5. Sulfathiazol " + Auréomycine 1,0 γ	2 4,1	5 29,4	25 52,0	7 41,2	18 37,5	4 23,5	3 6,2	1 5,8
6. Sulfathiazol " + Terramycine 0,5 γ	2 4,1	4 23,5	24 50,0	9 53,0	27 56,2	3 17,6	5 10,4	1 5,8
7. Sulfathiazol " + Hostacycline 0,5 γ	5 10,4	4 23,5	24 50,0	6 35,2	19 39,5	6 35,2	— —	1 5,8

La *chloromycétine*, préférée dans la thérapie des méningites — vu qu'elle atteint « in vivo » le plus haut niveau dans le sang et le L.C.R., s'est avérée relativement active « in vitro » dans les concentrations utilisées par nous. Le niveau de la *streptomycine*, dans le L.C.R. est connu comme étant presque nul lorsque le méninge est normal, atteignant en cas de méningite 1/10—1/5 du niveau sanguin.

Vis-à-vis des *autres Neisseria*, isolées de méningites et de porteurs, l'action des antibiotiques énumérés, par ordre d'efficience, « in vitro » dans une concentration égale à celle du sang, comparativement à l'efficience de la concentration du L.C.R., est celle présentée dans le tableau IV:

Il résulte de ces données que *ces espèces de Neisseria* présentent « in vitro » une plus grande résistance aux antibiotiques que le méningocoque; pour le sulfathiazol nous constatons un pourcentage d'environ trois fois plus élevé de souches résistantes (11,7%) vis-à-vis de 4,1% trouvées chez les méningocoques.

D'autres auteurs, comme SCHOENBACH et PHAIR (9), selon lesquels le méningocoque est plus sensible aux sulfamides, trouvent en 1943, 1,9% souches résistantes de méningocoques à la concentration de 5000γ/ml sulfadiazine; LOVE et FINLAND (7) ont observé en 1954, 12% souches de méningocoque faiblement résistantes à une concentration de 50γ/ml sulfadiazine. La sensibilité plus marquée vis-à-vis des sulfamides est attribuée aux nécessités métaboliques augmentées des *Neisseria* en certains facteurs de croissance; l'antagonisme compétiteur entre ces facteurs et les sulfamides étant bien connu.

Pour l'étude de la sensibilité des souches testées vis-à-vis de 7 associations de sulfathiazol avec les 8

antibiotiques essayés séparément, on a utilisé les concentrations les plus faibles de substance active pour chaque test, c'est-à-dire le niveau thérapeutique obtenu « in vitro » dans le L.C.R. Toutefois, les associations sulfathiazol + antibiotique, se sont montrées beaucoup plus efficaces (Tableau V).

Il ressort de ce tableau, que dans l'ordre de l'efficience, à la concentration thérapeutique du L.C.R., les associations les plus actives vis-à-vis du méningoque sont:

1. sulfathiazol + auréomycine = 4,1% souches résistantes
2. sulfathiazol + chloromycétine = 12,3% souches résistantes
3. sulfathiazol + streptomycine = 4,1% souches résistantes
4. sulfathiazol + hostacycline = 10,4% souches résistantes
5. sulfathiazol + pénicilline = 8,3% souches résistantes
6. sulfathiazol + terramycine = 4,1% souches résistantes
7. sulfathiazol + érythromycine = 8,3% souches résistantes

L'interprétation des résultats concernant le pourcentage des souches résistantes, doit se faire en rapport avec les pourcentages obtenus par les tests individuels et non par rapport avec l'ordre numérique absolu.

« In vitro » ces associations se sont montrées synérgiques, à l'exception de l'association sulfathiazol + érythromycine. Bien que l'érythromycine, testée séparément, se soit montrée l'antibiotique le plus actif après le sulfathiazol (6,1% souches résistantes) en association avec ce dernier, elle n'a montré qu'une action faiblement antagoniste (8,3% souches résistantes).

En préparant les associations, nous n'avons pas tenu compte des indications de JAWETS et coll. (6) concernant l'effet antagoniste qui existe entre les bactériostatiques et les bactéricides, attendu que l'étude de l'antibiose effectuée par nombre d'auteurs démontre que les germes en stase sont sujets à la bactériopexie et à la phagocytose exercées par les cellules de l'organisme, faits qui ont mis en discussion ces affirmations.

En ce qui concerne l'effet des associations sur les *autres Neisseria*, on a obtenu, toujours à la concentration des antibiotiques du L.C.R., selon la thérapie usuelle, les résultats suivants, par ordre d'efficience:

1. sulfathiazol + auréomycine 29,4% souches résistantes
2. sulfathiazol + pénicilline 23,5% souches résistantes
3. sulfathiazol + streptomycine 17,6% souches résistantes
4. sulfathiazol + hostacycline 23,5% souches résistantes
5. sulfathiazol + chloromycétine 23,5% souches résistantes
6. sulfathiazol + terramycine 23,5% souches résistantes
7. sulfathiazol + érythromycine 23,5% souches résistantes

L'interprétation des résultats sera faite selon le critérium indiqué pour les associations employées pour le méningocoque.

Le méningocoque s'est montré plus sensible que les *autres Neisseria* dans les tests « in vitro » avec des antibiotiques séparés et même des associations, ce qui pourrait expliquer, en partie, l'incidence plus élevée des méningites et d'autres infections provoquées les derniers temps par les *autres Neisseria*

Les résultats obtenus par la méthode des dilutions ont été en désaccord avec ceux obtenus par les deux méthodes diffusimétriques. Bien que pour la majorité des germes la recherche de la sensibilité aux antibiotiques soit plus précise lorsqu'elle est effectuée par la méthode des dilutions en série, permettant des

Tableau VI

Résistance des germes aux antibiotiques par rapport au type sérologique

Antibiotique/ml	Méningocoque résistant		Méningocoque groupe A		Méningocoque groupe B		Méningocoque groupe C		Non-typables	
	Nombre souches	%	Nombre souches	%	Nombre souches	%	Nombre souches	%	Nombre souches	%
1. Sulfathiazol 10.000 γ	2	4,1	2	100	—	—	—	—	—	—
2. Pénicilline 10 U	14	29,2	10	71,35	2	13,57	—	—	2	13,57
3. Érythromycine 50 γ	3	6,2	1	33,33	1	33,33	1	33,3	—	—
4. Streptomycine 60 γ	14	29,2	7	50,00	1	7,10	—	—	6	42,8
5. Chloromycétine 50 γ	30	62,5	12	40,00	8	26,60	2	6,6	8	26,6
6. Auréomycine 15 γ	38	79,1	20	52,60	7	18,40	2	5,2	9	23,7
7. Terramycine 10 γ	7	14,5	3	42,80	3	42,80	—	—	1	14,2
8. Hostacycline 10 γ	30	62,5	16	53,30	9	30,00	1	3,3	4	10,3
9. Sulfathiazol 2.000 γ + Pénicilline 0,5 U	4	8,3	1	25,00	1	25,00	1	25,0	1	25,0
10. Sulfathiazol " + Érythromycine 1,0 γ	4	8,3	2	50,00	—	—	—	—	2	50,0
11. Sulfathiazol " + Streptomycine 6,0 γ	2	4,1	1	50,00	—	—	—	—	1	50,0
12. Sulfathiazol " + Chloromycétine 5,0 γ	6	12,3	2	33,30	3	50,00	—	—	1	16,6
13. Sulfathiazol " + Auréomycine 1,0 γ	2	4,1	1	50,00	—	—	—	—	1	50,0
14. Sulfathiazol " + Terramycine 0,5 γ	2	4,1	3	60,00	—	—	—	—	2	40,0
15. Sulfathiazol " + Hostacycline 0,5 γ	5	10,4	1	50,00	—	—	—	—	1	50,0

distinctions plus nettes entre l'effet bactériostatique et bactéricide, cette discrimination n'a pas été possible dans nos conditions. On a souvent observé un manque total de développement, simulant une fausse sensibilité, même à de grandes dilutions d'antibiotiques, en présence desquelles la méthode diffusimétrique a montré de la résistance. Ceci est dû à la particularité des *Neisseria* de se développer faiblement en milieu liquide, probablement grâce à des substances inhibitrices résultant du métabolisme bactérien, de préférence en milieu liquide. D'ailleurs, la majorité des auteurs qui ont étudié l'antibiose chez le méningocoque ont utilisé des milieux solides. Soulignons que grâce à cette méthode, nous avons obtenu par passages sur boîtes Petri avec sang de mouton, des formes involutives (microcolonies) chez 5 souches de méningocoques et chez 2 souches d'*autres Neisseria*. Le méningocoque à donné des micro-colonies en présence des antibiotiques suivants: hostacycline, érythromycine et streptomycine; chez les *autres Neisseria*, avec le sulfathiazol et la chloromycétine. Il faut remarquer que trois souches ont donné des micro-colonies en présence d'un seul antibiotique et les autres quatre souches ont donné simultanément des micro-colonies vis-àvis de 2—3 antibiotiques.

L'examen microscopique des frottis effectués de ces micro-colonies, colorées par la méthode Gram, ne révèlent pas de modifications morphologiques et tinctoriales des germes.

Contrairement à l'opinion de la majorité des chercheurs qu'il n'existerait aucune corrélation entre le type sérologique et la sensibilité aux antibiotiques, nous avons trouvé un nombre plus élevé de souches de méningocoques du groupe A résistantes au sulfathiazol, pénicilline, streptomycine et auréomycine que des autres groupes (Tableau VI). Afin de pouvoir tirer des conclusions générales, il est nécessaire d'étudier cette corrélation sur un plus grand nombre de souches.

Quant à la dynamique de la résistance acquise avec le temps par 49 souches de *Neisseria*, isolées entre les années 1957—1959 et de 16 souches isolées les derniers deux ans, on n'observe aucune différence en ce qui concerne l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, à l'exception de l'action de la chloromycétine pour le méningocoque qui a augmenté allant de 69,9% souches anciennes résistantes à 91,5% souches résistantes, récemment isolées.

RÉSUMÉ

1. On a étudié la sensibilité « in vitro » envers 8 antibiotiques et 7 associations d'antibiotiques de 65 souches de *Neisseria* (48 souches de méningocoques et 17 *autres Neisseria*: *flavus* I, II, III, *flavescens*, *crassus*).

2. La sensibilité a été étudiée à l'aide de deux méthodes:

a) méthode diffusimétrique: antibiotique en poudre, incorporé dans l'amidon (Balş et coll) et disques en papier-filtre imprégnés avec diverses concentrations d'antibiotiques, dans les limites maximum et minimum du sang et du L.C.R., selon la thérapie usuelle;

b) méthode des dilutions sériées.

3. De tous les antibiotiques testés « in vitro », le sulfathiazol s'est montré le plus actif, surtout vis-à-vis du méningocoque; on a trouvé seulement 4,1% souches résistantes à la concentration du sang et 6,2% à la concentration du L.C.R.

Le sulfathiazol est actif aussi vis-à-vis des *autres Neisseria*; parmi celles-ci, le nombre de souches résistantes est toutefois environ 3 fois plus grand que celui du méningocoque (11,7% à la concentration du sang et 17,6%à la concentration du L.C.R.). Par ordre d'efficience, les suivants antibiotiques ont été actifs vis-à-vis des souches de méningocoqus: l'érythromycine, la terramycine, suivies par la pénicilline et la streptomycine, la chloromycétine étant moins active. L'hostacycline et l'auréomycine ont une activité réduite.

Envers les *autres Neisseria*, l'action des antibiotiques testés est plus faible que sur le méningocoque et en quelque sorte différente. Par ordre d'efficience, les plus actifs sont: l'érythromycine, la terramycine, la streptomycine, la chloromycétyne, la pénicilline, l'hostacycline; l'auréomycine est la moins active.

4. Les associations de sulfathiazol avec des antibiotiques marquent une efficience accrue de ces derniers, bien que dans l'association on n'ait utilisé que les plus petites concentrations des substances actives testées séparément (respectivement à la concentration du L.C.R.). Les associations les plus actives « in vitro » vis-à-vis du méningocoque, par ordre d'efficience sont: le sulfa-

thiazol + auréomycine, sulfathiazol + chloromycétine, sulfathiazol + streptomycine, sulfathiazol + hostacycline, sulfathiazol + penicilline, sulfathiazol + terramycine. Quant à l'érythromycine, bien que la plus efficiente au test individuel (6,2% souches résistantes), elle n'a plus montré en association, une activité augmentée, mais au contraire un léger antagonisme (8,3% souches résistantes).

5. En ce qui concerne la dynamique de la résistance acquise entre temps par 49 souches de *Neisseria*, isolées depuis 1954—1959, et par 16 souches, isolées les dernières deux années, on ne remarque pas une augmentation progressive de la résistance envers la majorité des antibiotiques, à l'exception de la chloromycétine vis-à vis du méningocoque, où l'on trouve 69,9% souches anciennes résistantes et 91,5% souches résistantes récemment isolées.

6. Pour le test effectué avec chaque antibiotique séparément, autant que pour les associations, les *autres Neisseria* se sont montrées plus résistantes que le méningocoque, ce qui pourrait expliquer, en partie, l'incidence plus élevée des méningites et infections avec ces *autres Neisseria*, observées ce dernier temps.

BIBLIOGRAPHIE

1. Balş M., Elian M. et Horodniceanu T. — Viaţa Medicală, 1958, **5**, 845.
2. Bunin K. V. — Antibiotiki, 1955, **4**, 103.
3. Chabert V., Boyer F. et Dechavassne M. — Ann. Inst. Pasteur, Paris, 1953, **85**, 56.
4. Eretz S. J. — Sovetskaia Medizina, 1951, **15**, 18.
5. Gastinel P. — Précis de Bactériologie Médicale, 1957, Masson & Cie, Paris.
6. Jawets E., Cunnison, Coleman — Science, 1950, **11**, 254.
7. Love B. D. et Finland M. D. — Am. J. Med. Sci., 1954, **228**, 534.
8. Lund E. — Acta Path. Microbiol. Scand., 1955, **34**, 431.
9. Schoenbach E. B. et Phair J. J. — Am. J. Hyg., 1948, **47**, 177.
10. Topciu A., Agopian Fl. et Marinesco Gh. — Pediatria, 1953, **2**, 62.
11. Taylor C. H. D. et coll. — J. Clin. Path., 1958, **11**, 421.
12. Mesrobeanu L. et Păunesco E. — Physiologie bactérienne, 1960, Ed. Académie R.P.R. Bucarest.

ИЗУЧЕЧИЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ В ПРОБИРКЕ НА НЕКОТОРЫЕ МЕСТНЫЕ ШТАММЫ *NEISSERIA MENINGITIDIS* И ДРУГИХ НАЙСЕРИЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

1. Изучали в пробирочных условиях чувствительность 65 штаммов найссерий (48 штаммов менингококка и 17 штаммов других найссерий *flavus* I, II, III *flavescens*, *crassus)* по отношении к 8 антибиотикам и 7 ассоциациям антибиотиков.

2. Определение чувствительности проводилось при помощи следующих методов:

а) Дифузиметрические методы: с применением антибиотиков в виде порошков в примеси с крахмалом (по Балш и сотрудн.) и бумажных дисков (из фильтровальной бумаги), пропитанных разными концентрациями антибиотиков, в пределах от максимальной до минимальной концентрации, полученных в крови и в спиномозговой жидкости в результате общепринятой терапии.

б) Метод последовательных разведений в пробирках.

3. Из всех антибиотиков, испытуемых в пробирке, сульфатиазол оказался наиболее активным, в особенности, по отношению к менингококкам, среди которых найдены только 4,1% устойчивых штаммов. Сульфатиазол действует также и на другие найсерии, однако среди них устойчивые штаммы встречаются в 3 раза чаще

(11,7%) по сравнении с менингококками. Следующие антибиотики оказались активными по отношении к штаммам менингококка (в порядке их эффективности): эритромицин, терамицин, затем пенициллин и стрептомицин; хлоромицетин оказался менее активным, хостациклин и ауреомицин проявляют очень слабое действие. На остальные найсерии, испытуемые антибиотики оказывают более слабое действие и немного отличающееся от их действия на менингококка. В порядке эффективности наиболее активными являются: эритромицин, терамицин, затем стрептомицин, хлоромицетин, пенициллин, хостациклин. Наименее активным оказался ауреомицин.

4. Ассоциация сульфатиазола с антибиотиками приводит к замечательному повышению эффективности последних, несмотря на то что в ассоциации применяли наименьшие концентрации активных веществ, испытуемых раздельно (соответственно концентрации в спиномозговой жидкости): сульфатиазол + ауреомицин, сульфатиазол + хлоромицетин, сульфатиазол + стрептомицин, сульфатиазол + хостациклин, сульфатиа-зол + пенициллин, сульфатиазол + терамицин.

Что касается эритромицина, то несмотря на то что при индивидуальном испытании, данный антибиотик оказался самым эффективным, (6,2% устойчивых штаммов) в ассоциации с сульфатиазолом его действие не только не усилилось, но, наоборот, наблюдался некоторый антагонизм 8,3% устойчивых штаммов.

5. Что касается динамики устойчивости, приобретенной со временем 49 штаммами найссерий, выделенными в течении последних двух лет, не отмечается повышения со временем устойчивости к большинству антибиотиков; составляет исключение устойчивость менингококков к хлоромицетину-среди старых штаммов обнаружено 69,9% устойчивых, а среди свежевыделенных = 91,5% штаммов.

6. Как при испытании с каждым антибиотиком раздельно, так и в ассоциациях, остальные найссерии оказались устойчивее менингококка, что может служить частичным объяснением большей частоты в последнее время менингитов и других инфекций, вызванных этими найссериями.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANTIBIOSE "IN VITRO" BEI EINIGEN ÖRTLICHEN STÄMMEN VON *NEISSERIA MENINGITIDIS* UND BEI ANDEREN *NEISSERIA*

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Empfindlichkeit *in vitro* für 8 Antibiotika und 7 ihrer Kombinationen wurde bei 65 Stämmen von Neisserien untersucht (48 Meningokokkenstämme und 17 andere Neisserien der Arten *flavus I*, II, III, *flavescens* und *crassus)*.

2. Zur Prüfung der Empfindlichkeit wurden folgende Verfahren angewandt:

a) Diffusimetrische Verfahren vermittels Gemischen von Antibiotika und Stärke (Balş u. Mitarb.) und mit den Antibiotika imprägnierten Filterpapierscheibchen. Die gewählten Konzentrationen lagen zwischen den bei der üblichen Therapie im Blut und Liquor festgestellten Mindest- und Höchstgrenzwerten.

b) Das Verdünnungsserienverfahren in Reagensrörchen.

3. Von allen *in vitro* geprüften Antibiotika erwies sich das Sulfathiazol als am wirksamsten, insobesondere im Falle der Meningokokken, unter welchen nur 4,1% widerstandsfähige Stämme angetroffen wurden. Sulfathiazol wirkt auch auf die anderen Neisserien, doch wurde unter letzteren eine 3 mal höhere Anzahl widerstandsfähiger Stämme (11,7%) als beim Meningococcus verzeichnet. In der Reihenfolge ihrer Wirksamkeit, waren folgende Antibiotika Meningokokken gegenüber aktiv: Erythromyzin, Terramyzin, dann Penizillin und Streptomyzin; Chloromyzetin war weniger wirksam, während Aureomyzin und Hostazyklin nur eine sehr geringe Wirksamkeit aufwiesen.

Die Wirkung der geprüften Antibiotika auf die anderen Neisserien ist schwächer als auf den Meningococcus und einigermassen davon verschieden. Am wirksamsten sind in der angegebenen Reihenfolge: Erythromyzin, Terramyzin, dann Streptomyzin, Chloromyzetin, Penizillin, Hostazyklin. Am wenigsten wirksam erwies sich Aureomyzin.

4. Die Verbindung von Sulfathiazol mit Antibiotika führte zu einer bedeutenden Wirksamkeitssteigerung, obwohl nur die niedrigsten Konzentrationen der gesondert geprüften aktiven Stoffe geprüft wurden (bzw. die Liquorkonzentrationen).

Die *in vitro* gegenüber Meningokokken wirksamsten Verbindungen sind in der nachstehenden Reihenfolge: Sulfathiazol + Aureomyzin, Sulfathiazol + Chloromyzetin, Sulfathiazol + Streptomyzin, Sulfathiazol + Hostazyklin, Sulfathiazol + Penizillin, Sulfathiazol + Terramyzin. Was das Erythromyzin betrifft und obgleich sich dieses Antibiotikum bei der gesonderten Prüfung am wirksamsten gezeigt hatte (6,2% widerstandsfähige Stämme), wies es in Verbindung mit Sulfathiazol keine Aktivitätserhöhung, sondern im Gegenteil, eine leicht antagonistische Wirkung auf (8,3% widerstandsfähige Stämme).

5. Was die Dynamik der im Verlauf der Zeit erworbenen Widerstandsfähigkeit betrifft, konnte bei 49 während der Zeitspanne 1954—1959 und bei 16 während der letzten zwei Jahre isolierten Neisserienstämmen kein Anstieg der Widerstandsfähigkeit gegen die meisten Antibiotika beobachtet werden. Eine Ausnahme macht das Chloromyzetin hinsichtlich des Meningococcus, indem unter den früher isolierten Stämmen 69,9% und unter den rezenten 91,5% widerstandsfähige angetroffen wurden.

6. Sowohl bei der gesonderten Prüfung mit jedem einzelnen Antibiotikum, als auch gegenüber Kombinationen, erwiesen sich die anderen Neisserien widerstandsfähiger als der Meningococcus, was die in letzter Zeit erhöhte Häufigkeit der durch diese Neisserien hervorgerufenen Gehirnhautentzündungen und anderen Infektionen zum Teil erklären konnte.

AN INVESTIGATION OF «*IN VITRO*» ANTIBIOSIS IN SOME LOCAL STRAINS OF *NEISSERIA MENINGITIDIS* AND IN OTHER *NEISSERIA*

SUMMARY

1. The *in vitro* susceptibility to 8 antibiotics and 7 of their associations was investigated in 65 strains of *Neisseriae*, i.e. in 48 meningococcus and in 17 other *Neisseriae* strains *(flavus* I, II, III, *flavescens, crassus)*.

2. The following methods were used for the susceptibility tests:

a) Diffusimetric methods. Both powdered antibiotics incorporated in starch (Balş et al.) and filter paper disks impregnated with various concentrations of the antibiotics were employed; the concentrations ranged from the lowest to the highest figures recorded in the blood and CSF following usual antibiotic therapy.

b) The serial dilution method in tubes.

3. Out of all the antibiotics tested *in vitro*, sulphathiazole displayed the highest activity, especially as regards meningococcus strains, no more than 4.1 per cent of which were found to be resistant. It is active against the other *Neisseriae* as well, but the incidence rate of resistant strains among the latter is about three times higher (11.7 per cent) than in meningococci. In the order of their efficiency, the following antibiotics were active against meningococcus strains: erythromycin, terramycin, followed by penicillin and streptomycin; chloromycetin is less active, while hostacycline and aureomycin display a very low degree of activity.

The action exerted on the other *Neisseriae* by the antibiotics tested is less intense than the meningococcus and slightly different in certain respects. Erythromycin and terramycin are the most active, followed in order of efficiency by streptomycin, chloromycetin, penicilin, and hostacycline. Aureomycin proved to be the least active.

4. The association of sulphatiazole with antibiotics resulted in a considerable increase of efficiency, also only the lowest concentrations of the separately tested active substance (i.e. the concentrations met with in the CSF) were used in the associations. In the order of their efficiency, the associations most active *in vitro* against the meningococcus were: sulphathiazole + aureomycin, sulphathiazole + chloromycetin, sulphathiazole + streptomycin, sulphathiazole + hostacycline, sulphathiazole + penicillin, sulphathiazole + terramycin.

As regards erythromycin, although it had proved the most efficient antibiotic when tested separately (6.2 per cent resistant strains), its association with sulphathiazole did not result in increased activity but when in a somewhat antagonistic effect (8.3 per cent resistant strains).

5. As regards the dynamics in the course of time of acquired resistance, 49 *Neisseria* strains isolated during the period 1954—1959 and 16 strains isolated in the past 2 years did not exhibit any increase of resistance in the course of time to most of the antibiotics. Chloromycetin in relation to the meningococcus forms an exception, since there were 69.9 per cent resistant strains among those isolated some time ago, and 91.5 resistant strains among the recently isolated ones.

6. The other *Neisseria* proved more resistant thant the meningococcus, both when tested with each antibiotic separately and in tests with associations of the latter. This might account to a certain extent for the higher incidence rate of meningitidis and other infections due to these *Neisseria*, as recorded during the past few years.

ÉTUDE DE L'ANTIGÉNICITÉ DU VACCIN ANTIPOLIOMYÉLITIQUE INACTIVÉ, SUR UN GROUPE D'ENFANTS DE BUCAREST

par

M. Marcovici, Elena Buimovici et Al. Calomfiresco

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service de la Poliomyélite)

— Manuscrit reçu le 17 octobre 1959 —

C'est en 1957 que le premier programme de vaccination antipoliomyélitique a été réalisé en Roumanie. Le programme comprenait les enfants âgés de 0 à 3 ans (et surtout les enfants fréquentant les crèches); le vaccin Lépine utilisé provenait de l'Institut Pasteur de Paris.

Le vaccin Lépine présentant d'importantes particularités de production vis-à-vis du vaccin Salk, l'étude de son efficacité s'imposait.

Nous présentons dans ce travail, les données obtenues sur l'antigénicité du vaccin, l'étude sur l'efficacité épidémiologique du vaccin Lépine ayant fait l'objet d'une communication précédente.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On a sélectionné 21 enfants âgés de 0 à 3 ans provenant des crèches de Bucarest, dont la majorité, en vertu de l'enquête épidémiologique, n'avaient eu aucun contact antérieur avec l'infection poliomyélitique. Les enfants ont été vaccinés complètement avec trois doses de 1 ml vaccin, inoculées par voie souscutanée au bras, à des intervalles de trois semaines; tous les enfants ont reçu la même série de vaccin. Jusqu'au moment de l'utilisation, le vaccin a été gardé à la température de $+4°$ à $+6°$, conformément aux prescriptions officielles. (1). Les enfants étaient parfaitement sains durant toute la période d'observation (4 mois).

Une semaine avant la vaccination et trois semaines après la dernière inoculation, on a récolté du sang, en vue de contrôler les anticorps vis-à-vis des trois types antigéniques de virus poliomyélitique.

Les sérums, après inactivation à $+56°$, ont été conservés à $-20°$, jusqu'au moment de l'examen.

On a utilisé la technique communiquée antérieurement par les auteurs (2). On a examiné les anticorps des sérums dilués de 1/2—1/512, vis-à-vis de 100 DCP_{50} (dose cyto-pathogène 50). Le titrage des sérums a été fait sur cultures de cellules trypsinisées de reins de singe.

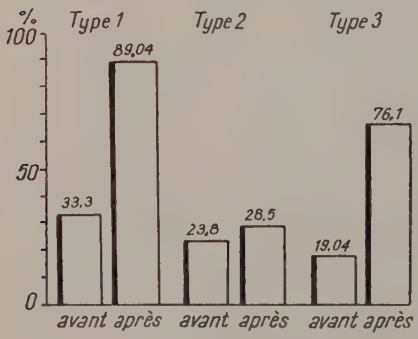
RÉSULTATS.

La répartition des sérums suivant le titre des anticorps vis-à-vis des trois types de virus poliomyélitique (souches prototypes *Mahoney*, *MEF*$_1$ et *Saukett)* est rapportée dans la tableau I.

Tableau I

Titre des anticorps	Nombre d'enfants avec anticorps type 1		Nombre d'enfants avec anticorps type 2		Nombre d'enfants avec anticorps type 3	
	avant la vaccination	après la vaccination	avant la vaccination	après la vaccination	avant la vaccination	après la vaccination
1/512	0	8	0	1	1	6
1/128	3	5	1	2	1	4
1/32	4	4	4	3	2	6
1/8	5	3	2	5	3	3
1/2	1	1	3	3	4	1
<1/2	8	0	11	7	10	1

On observe dans ce tableau que le groupe des enfants examinés a répondu aux antigènes du vaccin de manière différente par rapport au type de l'antigène. La souche 1342 type 1 du vaccin et la souche de virus type 3 *Saukett* se sont commportées comme des antigènes puissants. La souche type 2 *MEF*$_1$ possédait au contraire une faible capacité antigénique, stimulant la formation des anticorps dans une plus petite proportion et avec une intensité plus faible.



Graphique 1. — Pourcentage de la répartition des sérums avec titres d'anticorps 1/32 et plus, avant et après la vaccination.

D'après les données de certains auteurs, qui établissent le titre des anticorps de 1/32, comme indicateur de l'état d'immunité vis-à-vis de l'infection paralytique (4, 6) — la valeur du vaccin Lépine a varié par rapport au type de la souche. Cette situation est représentée dans le graphique 1.

Le graphique 1 montre la capacité antigénique élevée des souches de type 1 et 3 du vaccin. En échange, le pourcentage des enfants avec anticorps à titre de 1/32 et au dessus, en ce qui concerne le type 2 a été très peu modifié par la vaccination.

La présence dans le sérum — avant la vaccination — des anticorps de type homologue ou hétérologue et leur influence sur l'antigénicité du vaccin est donnée dans les tableaux II, III et IV.

Tableau II

Répartition des sérums suivant le titre des anticorps de type 1, avant et après la vaccination

< 1/2 pour les trois types	< 1/2	1/2	1/8	1/32	1/128	1/512
4			3		1	
	4	1		3		
		1			1	
			5	1	3	1
				4		4
					3	3

Légende : Le chiffre encadré représente le nombre des sérums avec le titre respectif d'anticorps avant la vaccination. Sur l'horizontale : répartition de ces sérums par rapport au titre obtenu à la suite de la vaccination.

Tableau III

Répartition des sérums suivant le titre des anticorps de type 2, avant et après la vaccination.

< 1/2 pour les trois types	< 1/2	1/2	1/8	1/32	1/128	1/512
4	4					
	7 3	2	2			
		3 1	1			1
			2 2			
				4 3	1	
					1 1	

Légende: voir tableau II.

Tableau IV

Répartition des sérums suivant le titre des anticorps de type 3, avant et après la vaccination.

< 1/2 pour les trois types	< 1/2	1/2	1/8	1/32	1/128	1/512
4			1	2	1	
	6	1	1	2	1	1
		4	1	1	2	
			3	1	1	1
				2	1	1
					1	1
					1	1

Légende: voir tableau II.

Il résulte des tableaux présentés que la vaccination a déterminé chez les enfants dépourvus d'anticorps, vis-à-vis de tous les trois types de virus poliomyélitique, l'élaboration des anticorps de type 1 et 3 à un titre de 1/8—1/128 (plus intense pour le type 3) et la non-production des anticorps de type 2 ou leur production à un titre non-décelable dans la réaction.

Dans le cas où avant la vaccination, les anticorps homologues étaient absents — les anticorps hétérologues étant présents — toutes les trois souches du vaccin se sont montrées antigéniques, bien qu'à différents degrés, dont le plus élevé pour le type 3 et le plus faible pour le type 2.

En cas de préexistence dans le sérum des anticorps de type 1 et 3, leurs titres ont toujours augmenté après la vaccination, à l'exception d'un seul cas où, pour le type 3, le titre s'est maintenu au même niveau. Les anticorps de type 2, dans des cas similaires, ont présenté le plus souvent le même titre que celui existant avant l'inoculation du vaccin.

On constate, de même, que la production des anticorps vis-à-vis d'un certain type était plus intense, à mesure que le titre des anticorps homologues — avant la vaccination — était plus élevé; dans ce cas aussi, l'antigène de type 2 est inférieur par comparaison aux deux autres antigènes.

La répartition — dans son ensemble — des sérums étudiés, suivant le titre des anticorps, avant et après la vaccination, est rapportée dans le graphique 2 — a.b.c.

Ces graphiques reflètent la dynamique des anticorps après l'inoculation du vaccin et illustrent l'évidente valeur antigénique des souches de type 1 et 3 du vaccin Lépine.

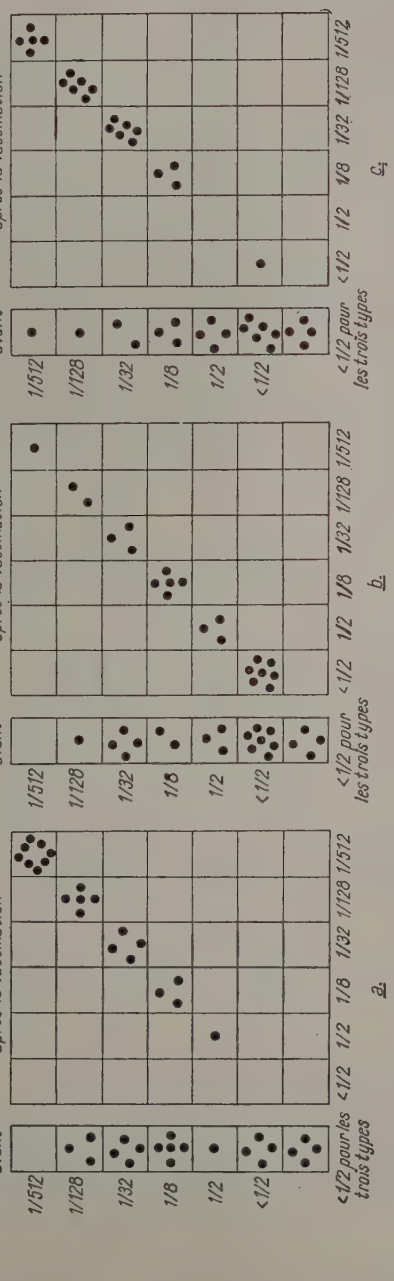
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Le vaccin type Lépine s'est montré antigénique, stimulant la formation des anticorps de type 1 et 3, et dans une moindre mesure, les anticorps de type 2.

Il faut particulièrement souligner que la souche de type 1 du vaccin possède des propriétés antigéniques élevées, vu que contrairement au vaccin Salk — pour lequel on emploie la souche de type 1 *Mahoney* (fortement virulente pour le singe et l'homme) — le vaccin Lépine contient une souche de type 1 atténuée (souche 1342). La sélection de cette souche a été faite dans le but de conférer au vaccin un plus grand degré de sûreté. Selon les données de LÉPINE, l'éventuelle persistance dans le vaccin — prêt à être employé — de 1—10 particules de virus sur cm^3 qui correspond à un résidu pratiquement incontrôlable, ne présente aucun danger, vu qu'il demeure 100.000 fois au-dessous de la dose intracérébrale paralytogène pour le singe (3).

Les données de cette étude représentent une contribution au problème de la valeur d'un vaccin inactivé obtenu d'une souche atténuée de virus.

En comparaison avec le vaccin Salk, le vaccin Lépine a présenté un degré d'antigénicité correspondant (8, 9). Il faut toutefois remarquer que pour déterminer un titre d'anticorps presque équivalent à



Graphique 2. — Répartition des sérums selon le titre des anticorps.

a — anticorps de type 1, avant et après vaccination; *b* — anticorps de type 2, avant et après vaccination; *c* — anticorps de type 3, avant et après vaccination;

celui donné par le vaccin Salk, le vaccin Lépine exige en plus un stimulus antigénique (3 inoculations vis-à-vis de 2 inoculations de vaccin Salk).

Nos résultats confirment les données de la littérature montrant que la préexistence des anticorps stimule par le vaccin la production des anticorps homologues. La présence — dans le sérum des enfants examinés — des anticorps vis-à-vis d'un certain type de virus poliomyélitique a également stimulé leur formation pour d'autres types (7, 10).

Il faut toutefois attirer l'attention sur la faible antigénicité de la souche type 2 du vaccin Lépine.

Aussi pouvons-nous remarquer que dans nos laboratoires on a obtenu des sérums de référence sur chèvres, à un titre élevé (1/1280) pour le type 1 et 3 de virus poliomyélitique et à un titre faible (1/40) pour le type 2 représenté par la souche MEF$_1$.

Le pouvoir antigénique élevé de la souche de type 1 du vaccin Lépine présente une importance capitale du point de vue épidémiologique. Les résultats de la présente étude sont confirmés par les données des recherches de Bucarest, concernant l'efficacité épidémiologique du vaccin Lépine, les enfants vaccinés étant protégés en proportion presque équivalente à celle rapportée pour le vaccin Salk (5).

BIBLIOGRAPHIE

1. Instructions for the use of pasteur institute polio—vaccine, 1956
2. Ionesco Mihaiesti C., Sergiesco D., Klein R., Horodniceanu F., Marcovici M. Buimovici E., Calomfiresco Al. et Ababei R. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1958, **17**, 5.
3. Lépine P. — Les acquisitions médicales récentes, 1956, 123.
4. Lépine P. — Assoc. Europ. Polio. III Symposium, Zürich, 29—30 sept. 1955, Rapp. et discuss., 1956, vol. III, 10.
5. Marcovici M., Calomfiresco Al. et. Wolski V. — Etude de la première vaccination antipoliomyélitique à Bucarest. L'efficacité épidémiologique du vaccin Lépine. Communication à la s.s.m. Section d'Hygiène, Bucarest, 20. V. 1958.
6. Pattyn S.R., Delville Y.P. et de Bont A.F. — Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 1957, **37**, 42.
7. Salk J. E. — Am. J. Publ. Health., 1954, **44**, 944.
8. Salk J.E. — Am. J. Publ. Health, 1955, **45**, 579
9. Salk J.E. — Am. J. Publ. Health, 1959, **46**, 1.
10. Tyrrell D., Keeble S. A. et Wood W. — Brit. Med. J., 1956, No. 4967, 598

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ПРОТИВОПОЛИОМИЭЛИТИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ НА ГРУППЕ БУХАРЕСТСКИХ ДЕТЕЙ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Исследовались антигенные свойства противополиомиэлитической вакцины Лепина на группе находящихся в яслях г. Бухареста 21 детей в возрасте 0—3 года. Титровались в сыворотке до- и после введения вакцины антитела в отношении 3 антигенных групп полиомиэлитического вируса. Штаммы типа 1 и 3 вакцины оказались хорошими антигенами у большинства детей. Наоборот, штамм типа 2 оказался обладающим слабыми антигенными свойствами.

Дети, у которых перед вакцинацией имелись противополиомиэлитические тела, дали наилучшую ответную реакцию после введения вакцины.

Результаты этих серологических исследований совпадают с результатами исследования эпидемиологической ефективности вакцины: привитые дети оказались защищенными приблизительно в 70% случаев во время эпидемии 1957 г., вызванной полиомиэлитическим вирусом типа 1.

UNTERSUCHUNG DER ANTIGENEN WIRKSAMKEIT DES INAKTIVIERTEN POLIOIMPFSTOFFES BEI EINER GRUPPE VON BUKARESTER KINDERN

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser untersuchten die antigene Wirksamkeit des *Lépineschen* Polioimfstoffes bei einer Gruppe von 21 Kindern im Alter von 0—3 Jahren, aus Kleinkinderbewahranstalten in Bukarest. Vor und nach der Schutzimpfung wurden die Antikörpertiter gegen die drei Antigentypen des Poliovirus im Blutserum bestimmt. Die im Impfstoff enthaltenen Stämme der Typen 1 und 3 erwiesen sich bei der Mehrzahl der Kinder als wirksame Antigene. Im Gegensatz dazu, war die antigene Wirksamkeit des Typus 2 gering. Kinder, die schon vor der Schutzimpfung Polioantikörper im Blutserum aufgewiesen hatten, sprachen auf die Impfstoffeinspritzung am besten an. Die Ergebnisse dieser serologischen Untersuchung stimmen mit den bei einer Untersuchung der epidemiologischen Wirksamkeit des Impfstoffes erhaltenen überein, aus welchen sich ergab, dass während der durch Poliovirus Typus 1 hervorgerufenen Epidemie des Jahres 1957 die geimpften Kinder zu etwa 70% geschützt worden waren.

A STUDY CONCERNING THE ANTIGENIC POTENCY OF INACTIVATED POLIO-VACCINE IN A GROUP OF INFANTS IN BUCHAREST

SUMMARY

The antigenic potency of Lépine's poliovaccine was investigated in a group of 0—3-year-old infants from various day-nurseries in Bucharest. Antibodies against the three antigenic types of poliovirus were determined in the blood serum, before and after inoculation of the vaccine. The type 1 and 3 strains of the vaccine proved to be good antigens in most of the infants, in contradiction to the type 2 strain whose antigenic potency was poor. Infants in whom polioantibodies had been present before vaccination displayed the strongest responses to the vaccine inoculation. The results of this serological study tally with those obtained in an investigation of the epidemiological efficiency of the vaccine, 70 per cent of the vaccinated infants having been protected during the 1957 epidemic which was caused by poliovirus type 1.

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES DES ENTÉROCOQUES, ISOLÉS EN DIFFÉRENTES CONDITIONS PATHOLOGIQUES, CHEZ L'HOMME

par

IRINA BELOIU, PAULA PLECEAŞ et ILEANA CAFFÉ

(Travail de l'Institut « Dr. I. Cantacuzino » — Service des Cocci pathogènes)

— Manuscrit reçu le 22 novembre 1960 —

L'importance dans la pathologie humaine des streptocoques groupe D (entérocoques) a sensiblement augmenté les dernières années. Ils provoquent des maladies variées et multiples: endocardite bactérienne sous-aiguë, infections du tractus digestif, de l'appareil uro-génital, etc., dont le traitement est assez difficile, vu la résistance relative de ces germes vis-à-vis d'un grand nombre d'antibiotiques et le fait qu'il exige d'importantes quantités de chimiothérapeutiques, ainsi qu'une thérapie prolongée.

MORIN, LAFON, GRAVELEAU, DELAVEAU (1) trouvent que les entérocoques représentent 50% du total des espèces de germes rencontrés dans l'endocardite bactérienne sous-aiguë, nos propres recherches révélant un pourcentage similaire de participation des entérocoques dans cette affection (2).

TOH et BALL (3) constatent des cas de plus en plus fréquents d'endocardite bactérienne sous-aiguë avec entérocoque, consécutifs non-seulement aux infections dentaires, mais aussi aux interventions effectuées sur le tractus urogénital ou gastro-intestinal.

L'incidence accrue de ces streptocoques dans les infections urinaires ressort également des données de SOCIAS et PORTOLES (4), qui trouvent des entérocoques en pourcentage de 58,2% chez 292 malades avec infections urinaires, dont le traitement aux antibiotiques n'a pas donné de résultats.

Ces faits nous ont incité à étudier la sensibilité à divers antibiotiques, de certaines souches d'entérocoques isolées chez l'homme, en différentes conditions pathologiques. Vu la diversité des espèces d'entérocoques, nous avons en même temps étudié les éventuelles variations pouvant être déterminées par l'administration des antibiotiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Souches étudiées.* Le matériel comprend 88 souches de streptocoques groupe D, isolées chez l'homme, dont 84 provenant de différentes infections (endocardite bactérienne sous-aiguë, infections de l'appareil urinaire, du tractus digestif, annexites, méningites, etc.) et 4 souches de sujets sains.

L'identification des espèces a été effectuée à l'aide de réactions biochimiques, sérologiques, ainsi que par le typage bactériophagique. L'appartenance sérologique au groupe D a été déterminée par la méthode LANCEFIELD et la lysosensibilité au bactériophage par nos propres préparations des phages 1, 5, 8.

B. — *Etude de la sensibilité aux antibiotiques.* On a étudié l'effet des antibiotiques suivants: pénicilline, streptomycine, association pénicilline-streptomycine, érythromycine, chloromycétine et tetracyclines de type terramycine, auréomycine, hostacycline.

L'effet antimicrobien a été analysé du point du vue qualitatif, en comparant deux méthodes diffusimétriques:

a) antibiotiques incorporés dans de l'amidon (5)

b) antibiotiques imprégnés, au moment de l'emploi, sur rondelles de papier filtre stérilisé (méthode ERNA LUND/6/).

Les souches à tester, cultivées 16 heures en bouillon de digestion peptique, diluées 1/100 au moment de l'utilisation, ont été ensemencées sur boîtes Petri avec gélose-sang de cheval 5%. Après maintien des boîtes une demi heure à 37°, on y a déposé les antibiotiques à étudier. Après incubation 16 heures à 37°, on a effectué la lecture macroscopique (7), appréciant le degré de sensibilité aux antibiotiques, par rapport au diamètre de la zone d'inhibition et en fonction de la méthode utilisée, ainsi qu'il résulte du tableau I.

Tableau I

Méthode	Diamètres de la zone d'inhibition (en mm.)			
	résistantes	faiblement sensibles	sensibles	très sensibles
Amidon	0— 4	5—15	16—20	>20
Erna Lund	0—15	16—20	21—30	>30

RÉSULTATS

A. — *Souches étudiées.* La provenance et la répartition par espèces des souches d'entérocoques sont indiquées dans le tableau II.

Les souches examinées provenaient: 53 d'urocultures (infections urinaires chroniques et autres affections), 25 d'hémocultures de malades à endocardite bactérienne 1 sous-aiguë, d'une infection dentaire (endocardite), 3 d'affections gynécologiques, 1 du liquide céphalo-rachidien (méningite), 1 de la bile (troubles digestifs), 2 de crachats et 2 du foie — nécropsie (morts accidentelles).

L'identification des espèces par les propriétés physiologiques a montré que la majorite des souches (62%) appartiennent à l'espèce *Str. faecalis* et ses variantes *zymogenes* et *liquefaciens*, les streptocoques *faecalis* atypiques représentant 26% et les espèces *Str. faecium*, *Str. durans* et *Str. bovis* 12% du total des souches. Toutes les souches appartiennent au groupe D Lancefield.

Tableau II

Répartition par espèces des souches d'enterocoques isolées chez l'homme

Souches isolées de	Nombre souches	Espèce						
		Str. faecalis	Str. faecalis var. zymogènes	Str. faecalis var. liquefaciens	Str. faecalis atypiques	Str. faecium	Str. durans	Str. bovis
Urocultures	53	20	13	—	16	2	1	1
Hémocultures	25	12	3	—	6	3	1	—
Dents (endocardite)	1	1	—	—	—	—	—	—
Annexite (ponction)	3	—	2	1	—	—	—	—
L.C.R.	1	—	—	—	—	1	—	—
Bile	1	—	—	—	—	1	—	—
Crachat	2	2			—	—	—	—
Foie (nécropsie)	2	1	—	—	1	—	—	—
Total souches	88	36	18	1	23	7	2	1
%		40,90	20,45	1,13	26,13	8,0	2,26	1,13

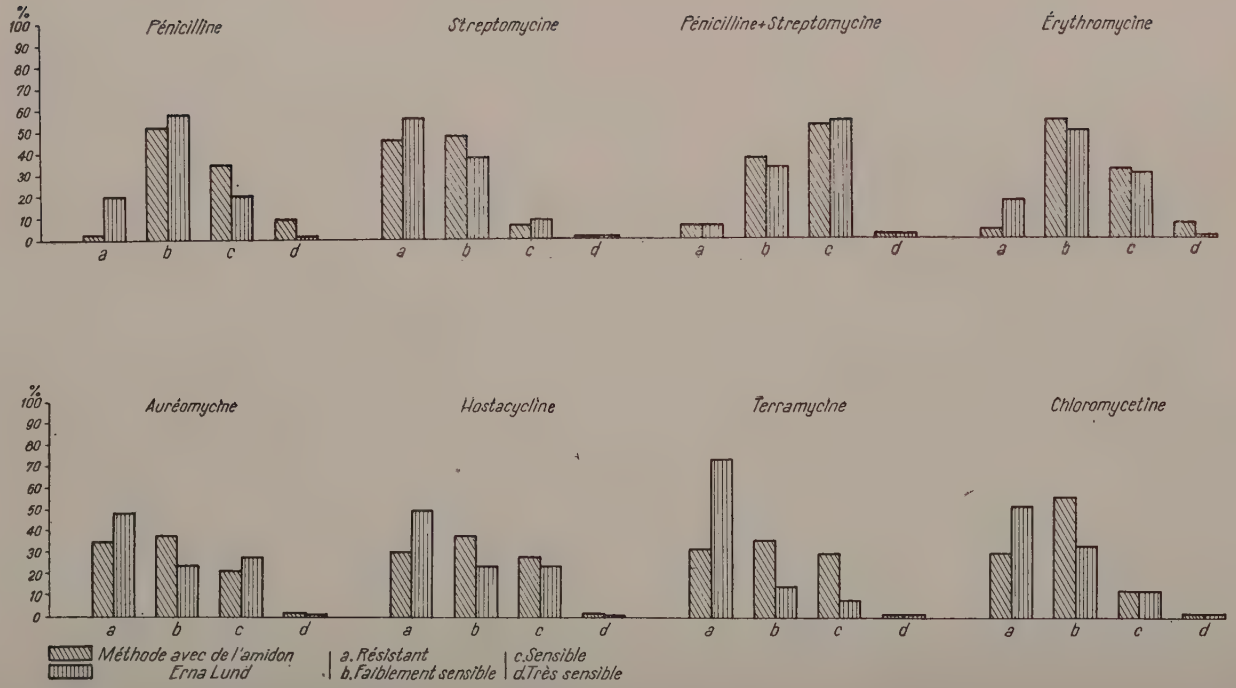
Le comportement vis-à-vis des phages confirme nos observations antérieures (8) sur la spécificité des phages 1, 5 (isolés ou associés) pour les espèces *Str. faecalis* avec ses variantes *zymogenes* et *liquefaciens* et celle du phage 8 pour les souches de type animal.

B. — *Sensibilité aux antibiotiques.* La comparaison des deux techniques employées dans le but de déterminer l'action inhibante des antibiotiques envers les souches étudiées, a montré de petites différences procentuelles (graphique 1). Les résultats concernant le spectre antimicrobien ont été appréciés par la méthode des antibiotiques incorporés dans de l'amidon; cette méthode, simple et sensible, présente en plus l'avantage d'une conservation prolongée de l'antibiotique.

Ainsi qu'il résulte du graphique, 2, 55% des souches étudiées sont sensibles (y compris les souches très sensibles) à l'association pénicilline-streptomycine, 45% à la pénicilline et 40% à l'érythromycine, alors que la streptomycine (antibiotique au pouvoir inhibant le plus faible) est active seulement dans 6% des cas.

Pour le groupe des tetracyclines, la sensibilité des souches testées varie entre 26% et 30%, tandis que seulement 13% des souches sont sensibles à la chloromycétine.

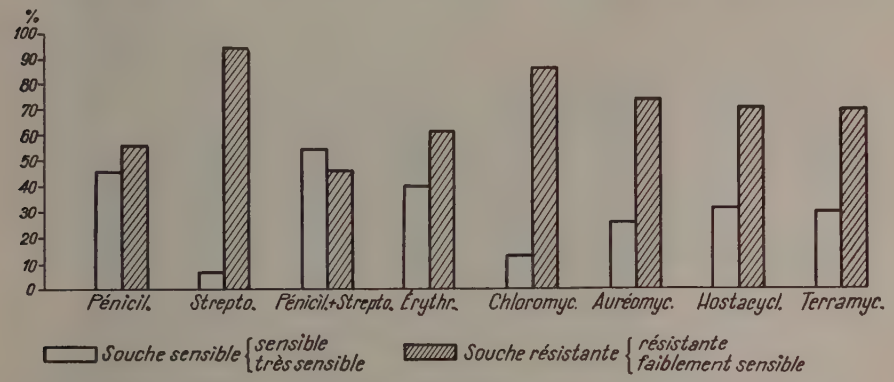
Sensibilité aux antibiotiques des différentes espèces d'entérocoques. Signalons le fait que la comparaison de la sensibilité aux antibiotiques des diverses espèces d'entérocoques étudiées, a révélé un comportement tout-à-fait différent de la variante *zymogenes*. Cette espèce bêta-hémolytique de streptocoque groupe D



Graphique 1. — Représentation comparative de la résistance et des différents degrés de sensibilité des entérocoques aux antibiotiques.

est insensible à la streptomycine dans 78% des cas, ce qui explique le pourcentage très réduit d'entérocoques inhibés par cet antibiotique.

Il ressort de nos observations « in vitro » que l'association pénicilline-streptomycine fait preuve d'un synergisme accentué, dans le sens qu'elle diminue approximativement deux fois le nombre des souches résistantes à la pénicilline et à la streptomycine, considérées séparément. On sait que dans les infections à



Graphique 2. — Sensibilité et résistance des entérocoques aux antibiotiques notées par la méthode à l'amidon.

entérocoques (infections du tractus génito-urinaire, endocardite bactérienne sous-aiguë, etc.) le traitement comporte de grandes difficultés, même en pleine « époque des antibiotiques »; la persistance prolongée de ces germes peut être attribuée à une résistances acquise au cours du traitment, à l'utilisation d'un antibiotique non-aproprié, ou bien à une infection massive avec localisations multiples dans laquelle le traitement tardivement institué n'est plus efficace, malgré la sensibilité des germes « in vitro ».

Nous présentons quelques observations, illustrant les faits mentionnés:

Obs. I. — Le malade K.D. avec septico-pyoémie a éliminé par l'urine durant 2 mois la même espèce d'entérocoque *Str. faecalis* var. *zymogenes* sensible au phage 5. Pendant cette période, le patient a reçu 54 g érythromycine et 36 g de trisulfamide. Les entérocoques isolés étaient sensibles à la pénicilline, à l'association pénicilline-streptomycine et faiblement sensibles à l'érytromycine. Au dernier examen, les germes étaient devenus résistants à l'érythromycine.

Ce cas représente un exemple d'utilisation d'un antibiotique non-approprié.

Obs. II. — La malade D.M. avec endocardite bactérienne sous-aiguë a été observée pendant 12 mois, durant lesquels on a examiné 3 hémocultures positives pour l'entérocoque, en déterminant l'espèce *Str. faecalis* atypique. L'extraction d'une molaire a permis d'identifier chez cette malade la même espèce d'entérocoque, présentant aux antibiotiques une réponse semblable à celle obtenue par les souches du torrent circulatoire.

Tous les germes isolés étaient sensibles à la pénicilline, l'association pénicilline-streptomycine et l'érytromycine, sensibilité qui s'est maintenue non-modifiée.

Malgré le traitement intensif à la pénicilline et streptomycine, la malade a succombé. Ce cas montre l'inefficacité des antibiotiques, administrés probablement trop tard, l'autopsie de la malade révélant une infection généralisée massive avec localisations multiples dans la rate, le foie, etc.

Les observations III et IV montrent la succession de diverses espèces d'entérocoque dans l'urine, sous l'influence du traitement aux antibiotiques, ainsi que la persistence de ces germes, comme suite de l'application d'un traitement inadéquat ou de l'utilisation de quantités insuffisantes de l'antibiotique approprié.

Obs. III. — La malade D.F. avec diagnostic de cystite, élimine par l'urine, pendant 5 mois, des espèces variées d'entérocoques. Le premier examen bactériologique ayant révélé la présence de l'espèce *Str. bovis*, faiblement sensible à la pénicilline et auréomycine, on lui a administré 5 g auréomycine, 2 millions U. pénicilline et 3 g streptomycine. Les urocultures ultérieures montrent la disparition de l'espèce *Str. bovis* et l'apparition d'une variante de *Str. faecalis*, faiblement sensible à la pénicilline. Après un mois d'interruption du traitement, on a isolé aux examens bactériologiques ultérieurs l'espèce *Str. faecalis* sensible à la pénicilline et streptomycine, non-modifiée du point de vue sensibilité aux antibiotiques.

Obs. IV. — Le malade C.A. avec glomérulo-néphrite streptococcique a éliminé par l'urine pendant 6 mois, des entérocoques associés avec *E. coli*. L'étude des entérocoques a montré une succession d'espèces: *Str. bovis*, *Str. faecalis* isolées à deux examens répétés et *Str. faecalis* atypique, sensible à la pénicilline, à l'association pénicilline-streptomycine et à l'érythromycine. Le malade a reçu pendant 2 mois environ 10 millions U. pénicilline, suivies de 5 g érythromycine. Toutefois, la dernière uroculture effectuée 6 mois après l'institution du traitement, a mis en évidence un entérocoque, présentant la même sensibilité aux antibiotiques sus-mentionnés.

DISCUSSION

De l'étude effectuée sur 88 souches d'entérocoques isolés chez l'homme, il résulte que les diverses espèces marquent une sensibilité assez prononcée à l'association pénicilline-streptomycine, une sensibilité relative à la pénicilline et à l'érythromycine et une résistance accrue à la streptomycine, dont l'action est presque nulle sur la variété *zymogenes* de l'entérocoque. Les entérocoques isolés en diverses conditions pathologiques n'ont pas présenté de différences importantes du point de vue de leur comportement envers les antibiotiques.

L'étude de l'action des antibiotiques « in vitro » montre la possibilité d'une intervention efficace de l'association pénicilline-streptomycine lorsqu'il s'agit de souches insensibles à la streptomycine ou faiblement sensibles à la pénicilline; l'érythromycine et la chloromycétine peuvent remplacer, dans une certaine mesure, l'association pénicilline-streptomycine. D'autre part, l'érythromycine et les tetracyclines exercent un effet positif sur les souches résistantes à la pénicilline.

Cependant, pour la conduite thérapeutique, il faut tenir compte d'une série d'éléments qui influencent, dans une grande mesure, les résultats de l'utilisation des antibiotiques.

Bien que, dans certains cas, l'érythromycine, la chloromycétine ou les tetracyclines donnent « in vitro » des résultats encourageants, leur utilisation

dans la clinique doit être limitée ou même évitée, vu qu'ils exercent une action uniquement bactériostatique, créent la résistance (surtout à l'érythromycine) et ne peuvent atteindre des titres efficients dans l'organisme.

Par conséquent, on recommande dans le traitement des diverses infections à entérocoques l'association pénicilline-streptomycine, qui ne permet point l'installation de la résistance; en plus elle permet l'administration de grandes quantités, exerçant un effet synergique et une action bactéricide.

Il faut souligner l'importance de l'institution d'un traitement précoce soutenu et prolongé, surtout en cas d'endocardite, où même l'antibiotique d'élection agit difficilement sur les germes greffés au niveau des valvules du cœur.

Quant aux éliminateurs urinaires de durée, de la même ou de différentes espèces de germes, l'antibiogramme s'impose afin de nous guider dans l'application judicieuse du traitement et l'emploi de l'antibiotique indiqué, en fonction des variations d'espèce ou de sensibilité survenant pendant la période de la thérapie.

L'élimination des différentes espèces d'entérocoques peut être interprétée dans le sens d'une élimination successive de germes qui traversent la barrière entéro-rénale, ou bien dans celui de la disparition de certaines espèces et l'apparition d'autres espèces à spectre de sensibilité différent, comme suite de l'antibiothérapie.

CONCLUSIONS

L'espèce *Str. faecalis* avec ses variantes réunissent un pourcentage de 62% des 88 souches de streptocoques groupe D isolées chez l'homme en diverses conditions pathologiques.

L'étude de la sensibilité de ces souches aux antibiotiques, effectuée par la méthode diffusimétrique a révélé:

— L'association pénicilline-streptomycine constitue la combinaison la plus indiquée dans le traitement des infections entérococciques.

— L'érythromycine, qui a un spectre d'activité proche de celui de l'association pénicilline-streptomycine, n'est pas recommandée, vu qu'elle crée des races résistantes de germes et n'exerce qu'un effet bactériostatique.

— La chloromycétine et les tetracyclines ont une faible action sur les entérocoques

— La persistence prolongée des entérocoques dans diverses affections peut être due à l'application d'un traitement aux antibiotiques non-approprié, à l'utilisation de quantités insuffisantes, ou à l'institution tardive du traitement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Morin M., Lafon J. Graveleau J., et Delaveau P. — Congr. Franç. Méd. (31-e Session), Paris, 1957, 195
2. Baldovin-Agapi C., Beloiu I. et Caffe I. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1961, **20**, 480
3. Toh C.C.S. et Ball K.P. — Brit. Med. J., 1960, **2**, 640.
4. Socias A. et Portoles A. — Microb. Espanola, 1957, **10**, 5
5. Hermann W. — Med. Wschrft., 1954, **8**, 192.
6. Lund E. — Acta Path. Microbiol. Scand., 1951, **29**, 221.
7. Taylor C.E.D., Heimer G.V. et Spiecer C.C.—J. Clin. Path., 1958, **11**, 421.
8. Ciuca M., Baldovin-Agapi C., Mihalco Fl., Beloiu I. et Caffe I. — Arch. Roum. de Path. exp. et de Microbiologie, 1959, **18**, 519.
9. Bals M., Elian M. et Horodniceanu Th. — Viaţa Medicală, 1958, **5**, 845.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ ЭНТЕРОКОККОВ ВЫДЕЛЕННЫХ У ЧЕЛОВЕКА В РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

КРАТКОЕ СОДЕРЖАНИЕ

Авторы исследовали выделенные у человека 88 штаммов стрептококков группы Д. Вид Str faecalis с его варианты предетавляют 62 всех изучаемых штаммов.

Изучение чувствительности данных штаммов к антибиотикам, проведенное при помощу диффезиметринеского способа, привело к следующим выводам:

Пенициллин + стрептомицин представляет собою наиболее полезное сочетание, которым следует пользоваться при лечении инфекций, вызываемых энтерококками.

Эритромицин, обладающий спектром активности, который приближается к сочетанию пенициллин + стрептомицин не рекомендуется, так как он благоприятствует созданию резистентных рас возбудителя и оказывает только бактериостатическое действие.

Хлоромицетин и тетрациклины обладают слабой активностью.

Продолжительное сохранение энтерококков в организме при различных заболеваниях может быть результатом неправильного использования антибиотиков, применения химиотерапевтических препаратов в недостаточных количествах, или же позднего начала лечения.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EMPFINDLICHKEIT FÜR ANTIBIOTIKA BEI UNTER VERSCHIEDENEN PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN VOM MENSCHEN ISOLIERTEN ENTEROKOKKEN.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Verfasser untersuchen 88 von Menschen isolierte Streptokkenstämme der Gruppe D. Die Art *Str. faecalis* und ihre Varianten waren in einem Prozentsatz von 62% vertreten. Die Prüfung der Empfindlichkeit für Antibiotica dieser Stämme, die durch die diffusimetrische Methode untersucht wurde, zeigte:

Die Assoziation von Penizillin und Streptomyzin stellt die wirksamste Kombination dar, die bei der Behandlung von Enterokokkeninfektion anzuwenden ist.

Die Verwendung von Erythromyzin, dessen Wirkungsspektrum dem der Assoziation Penizillin-Streptomyzin nahekommt, ist nicht anzuempfehlen, da es die Entstehung widerstandsfähiger Keimrassen begünstigt und nur eine bakteriostatische Wirkung ausübt.

Chloromyzetin und die Tetrazykline sind Enterokokken gegenüber nur schwach wirksam.

Die lange Persistenz der Enterokokken bei verschiedenen Erkrankungen kann auf die Anwendung einer nicht entsprechenden Behandlung mit Antibiotika, auf die Verwendung von Chemotherapeutika in ungenügenden Mengen oder auf das zu späte Einsetzen der Behandlung zurückzuführen sein.

A STUDY CONCERNING THE SUSCEPTIBILITY TO ANTIBIOTICS OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM HUMANS DURING VARIOUS PATHOLOGICAL CONDITIONS

SUMMARY

The authors have investigated 88 strains of streptococci of the D group isolated from human subjects. The species *Str. faecalis* and its variants were present in 62 per cent of the cases. The susceptibility to antibiotics of these strains, investigated by diffusimetric method, revealed:

The use of erythromycin whose range of activity approximates that of the penicillin-streptomycin association, is not advisable, since it promotes the appearance of resistant germ strains and exerts but a bacteriostatic action.

Chloromycetin and the tetracyclines are poorly active *versus* enterococci.

The association of penicillin to streptomycin affords the most useful combination to be applied in the treatment of enterococcal infections.

The long persistence of enterococci in various affections may be due to the administration of an inadequate antibiotic treatment, to the use of chemotherapy in insufficient doses, or to the delayed initiation of the treatment.

TABLE DES MATIÈRES

Recherches épidémiologiques sur un foyer de fièvre « Q » dans une ferme à caractère agro-zootechnique, par G. Zarnea, N. Alexandresco, Honorina Ionesco, R. Voicoulesco, Lucia Szegli, S. Perederi et P. Munteanu 1

La réaction de précipitation en gel avec des antigènes rickettsiens, par G. Zarnea, Natalia Mitrica et Honorina Ionesco 13

Recherches sur les éliminateurs urinaires dans la brucellose humaine, par Ofelia Dimitriu, C. Bonciu, Al. Cerbu et Th. Vasilesco 21

Comparative study on different strains of *L. biflexa* as antigen for the complement fixation test in leptospirosis, by Nina Sturdza and M. Elian 33

Contribution à l'étude des inclusions protoplasmatiques de la médullo-surrénale de l'homme, par C. Bonciu, Al. Ionesco et V. Belis 43

Recherches sur l'immunité active de l'homme dans la dysenterie bacillaire. Note I, par G. Istrati 53

La sensibilité aux antibiotiques des anaérobies du genre *Clostridium*, déterminée « in vitro » par diffusion circulaire en gélose, par J. Bittner, Viorica Voinesco et S. Antohi 63

L'influence de l'irradiation ionisante sur l'évolution et le traitement au néosalvarsan de la trypanosomiase expérimentalle du rat, par N. Muntiu, N. Chelemen, T. Andrian, I. Corneciu, I. Băditoiu et C. Iuga 77

Apparition de variantes de phase, pathogènes et apathogènes, chez la *Shigella flexneri 2a* sous l'action du bactériophage et du sérum hétérologue, par G. Istrati, T. Meitert et C. Ciufeco 87

Recherches sur un milieu liquide d'enrichissement pour le diagnostic bactériologique de la diphtérie, par G. Calalb, Alice Saragea, Paula Maximesco, avec la collaboration de Natalia Cioroianu, Ana Popesco, Suzana Popa et Ana Mihailesco 95

Contribution à l'étude de la biologie des *Klebsiella*. III. Etude chimique et immunologique des polysaccharides isolés de deux souches capsulées et de leurs variantes non-capsulées, par Cella Barber et Silvia Eustatziou 103

Character of plaque formation by *polioviruses* in various common cell culture systems, by Dina Sergiesco, R. Klein and F. Horodniceanu 115

L'étude de l'embryogenèse des oeufs d'*Ascaris lumbricoides* dans des conditions variées d'oxygénation du milieu, par Angela Soresco, D. Panaitesco, C. Ciurea et Larissa Ianco 129

Rayon effectif de diffusion (R_{ES}) de la molécule de dextran et son importance, par D. Stavri 137

Données concernant l'application de la « méthode de blocage » dans la préparation de certains sérums de diagnostic, par N. Olinici, Sofia Lescinschi, en collaboration avec Alexandrina Ivasco 145

Contribution à l'étude de l'avidité du sérum anti-tétanique, par P. Condrea, Elena Poenaru, Mira Esrig et J. Bittner 161

Etude expérimentale sur la vaccination intensive par voie orale avec le vaccin B.C.G., par Virginia Botez, I. Angelesco, C. Bonciu, Maria Paraschivesco et Monica Petrovici 171

Le vaccin associé diphtéro-tétano-pertussis, Note I. par G. Calalb, Elena Poenaru, N. Pozsgi, Alice Saragea, Ecaterina Stanica, Paula Maximesco, H. Kranzdorf, Cecilia Stoian, Mira Esrig et Viorica Andreesco-Ţigoiu 181

Considérations sur les épidémies streptococciques d'origine alimentaire, par Coralia Baldovin-Agapi, Florica Mihalco, Leia Borsai, Margareta Chiresco, G. E. Panaitesco, T. Grigoriu et Natalia Munteanu 191

Contribution à l'étude de la structure antigénique des *Brucella*. I. Séparation de l'antigène M et de quelques complexes qui le contiennent, par CELLA BARBER, OFELIA DIMITRIU, TH. VASILESCO et AL. CERBU 201
Contribution à l'étude de la mobilité des colonies bactériennes, Note III. Le rôle des cils, par A. SĂSĂRMAN 215
Contribution à l'étude de la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques *(Viridans)* I. Méthodes d'extraction des antigènes et des polysaccharides, par CELLA BARBER, CORALIA BALDOVIN-AGAPI, IRINA BELOIU et ILEANA CAFFÉ . . 219
Contribution à l'étude de la structure antigénique des streptocoques non-hémolytiques *(Viridans)*. II. Fractionnement des antigènes isolés de streptocoques non-hémolytiques, par CELLA BARBER, CORALIA BALDOVIN-AGAPI et IRINA BELOIU 231
L'agglutination des hématies d'homme, formolées et tannées, par les sérums humains (agglutination HFT). Note I. Description de la méthode, définition de l'unité hémagglutinante conventionnelle (UHC) et interprétation statistique des résultats obtenus avec 55 sérums normaux, par R. WEINBACH 239
L'agglutination des hématies d'homme, formolées et tannées, par les sérums humains (agglutination HFT). Note II. L'applicabilité du test HFT en vue de la sélection objective des donneurs de sang, capables de transmettre l'hépatite virotique, par R. WEINBACH, N. MOLDOVAN et P. STERESCO 249
Recherches sur les pénicillinases bactériennes. Note III. Relations entre l'élaboration de la pénicillinase et la sensibilité à la pénicilline des souches de *B. anthracis*, par THEA HORODNICEANU et A. SĂSĂRMAN 257
Recherches « in vitro » concernant l'action des associations d'antibiotiques sur les anaérobies du genre *Clostridium* (communication préliminaire), par J. BITTNER, S. ANTOHI et VIORICA VOINESCO 263
Le diagnostic bactériologique, séro-allergique complexe de la coqueluche, par IRINA SOARE, MARIA GOLĂESCO et ARETY SCURTU 269
Über die Lysogenie und Lysosensibilität bei *Pseudomonas aeruginosa*. Lysotypieversuche, von T. MEITERT und EUGENIA MEITERT 277
Recherches sur le mécanisme de synthèse de la prodigiosine par le *Serratia marcescens*, par D. STAVRI et A. MARX 287
Prepararea serului hemolitic anti-oaie pe cobai şi experimentarea lui în reacţia Bordet-Wassermann, de MARIA SORESCO, ECATERINA STĂNICĂ şi CECILIA STOIAN . . 295
Observations biochimiques et sérologiques sur 240 souches de *Sh. flexneri* type 2, étude de la structure antigénique de certaines variantes de phase apparues spontanément, par A. GOREA et T. MEITERT 301
Etude de la structure antigénique et la variation de phase de certaines souches de *Sh. flexneri* type 5, par T. MEITERT et A. GOREA 313
La résistance spécifique conférée par la vaccination antityphoparatyphoïdique, comparée à l'état d'immunité des anciens malades de fièvre typhoïde, critériums d'appréciation de l'efficacité du vaccin TAB, par N. NESTORESCO, T. GRIGORIU, ELISABETA BĂDULESCO, I. SOLOMON, A. BARBU, ECATERINA VASILIU, MARIA IONESCO, A. CALOMFIRESCO, P. BORDEIANU, GH. ALESSEANU et GH. PANAITESCO 321
Recherches sur le rôle du système réticulo-endothélial dans l'immunité de la trichinellose expérimentale, par GH. LUPASCO, PAULA SOLOMON, ALICE HACIG, AL. GH. CIPLEA, C. CIUREA et LARISSA IANCO 337
Activité de certains phages isolés du sol ou de souches lysogènes de *B. cereus* sur différentes souches de bacilles aérobies sporulés et en particulier sur les *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. mycoides*, par N. STAMATIN et S. ANGHELESCO 357
Etude sur l'application du test de pathogénite de Serény dans l'isolement des *Shigella*, par M. BALS et M. LEONESCO 365
Sensibilité aux antibiotiques des germes du groupe *Proteus*, isolés chez l'homme et le rapport avec leur structure antigénique, par N. NESTORESCO, MARCELLA POPOVICI, D. FLORESCO, ELISABETA BĂDULESCO, D. C. RACOVIŢA et EMILIA THOMAS . . 375
Particularités de la résistance aux antibiotiques de certaines souches de *Staphylococcus* et de *Salmonella*, isolées des malades sous l'influence du traitement aux antibiotiques, par N. NESTORESCO, ECATERINA ALEXENCO, COLETTE GEORGESCO, SANDA ŢUPA, LUCIA SZÉGLI et ILEANA CAFFE 381
Etudes expérimentales concernant la résistance acquise des staphylocoques aux antibiotiques « in vivo », par MARCELLA POPOVICI et ECATERINA ALEXENCO 387

Influence de l'emploi cyclique des antibiotiques sur les caractères des staphylocoques isolés dans une maternité, par Marcella Popovici, N. Nestoresco, Ecaterina Alexenco, Luiza Soare, Elena Ghioni, D. Alessandresco et G. Teodoru . 393
Les endotoxines thermolabiles (neurotoxines) des germes Gram-négatifs. I. Les neurotoxines du bacille typhi murium « S » et « R », par Lydia Mesrobeanu, I. Mesrobeanu et Natalia Mitrica 399
Sensibilité aux antibiotiques de certaines souches de *Brucella*. Note I., par Ofelia Dimitriu, Al. Cerbu et Th. Vasilesco 425
Effet cytotoxique de la *Bordetella pertussis* sur les cultures de tissu He La, Kb, Detroit et tissu d'embryon humain, Note I., par N. Pozsgi, Viorica-Andreesco-Tigoiu et D. Dona 431
Sensibilité des anophèles adultes aux insecticides à effet rémanent, en Roumanie, par Gh. Lupasco, Maria Duport, Maria Săndulesco, Aurelia Cristesco, Ileana Combiesco et Ionela Săndesco 441
Recherches sur les systèmes phago-bactériens chez les Mycobactéries saprophytes et pathogènes, par G. Eustatziou, Silvia Eustatziou, Eugenia Meitert, Maria Antohi et Viorica Bogdănesco 461
Contribution à l'étude des méthodes d'isolement du *Cl. perfringens*. Note I. Une nouvelle méthode d'enrichissement pour l'isolement du *Cl. perfringens* par coproculture, par A. Săsărman et Thea Horodniceanu 471
Les espèces de streptocoques non-hémolytiques rencontrées dans l'endocardite sous-aiguë et leur sensibilité aux antibiotiques, par Coralia Baldovin-Agapi, Irina Beloiu, Ileana Caffe et Paula Pleceas 479
Etude sur les modifications des protéines plasmatiques chez les chevaux infectés expérimentalement avec le virus A.I.C. et leurs relations avec les modifications morphologiques et immuno-sérologiques, par M. Iliesco, St. Berceanu, Al. Ţurcanu, Henriette Vainer, Elena Rădulesco et M. Ţaga 491
Recherches sur la valeur du test de la kérato-conjonctivite dans l'isolement des *Shigella*, par H. Dunăreanu et Gh. Brindus 503
Séparation d'un polymère constitué d'acide α-aminobutyrique à partir de la *Bordetella pertussis*, par Cella Barber et Irina Soare 511
L'agglutination des hématies d'homme, formolées et tannées, par les sérums humains (agglutination HFT). Note III. Valeur du test HFT pour le diagnostic de l'hépatite virotique (HV), par N. Moldovan, R. Weinbach, P. Steresco, O. Sferdian et E. Goldis 517
Recherches sur le comportement de deux lignées de souris vis-à-vis des vaccins typhiques vivants ou tués. Note, par Marcela Nicolesco 523
Etude chimique des antigènes extraits de différents types de méningocoques, par Eugenia Podhorski-Costin et Aurica Topciu 529
Recherches sur la valeur de deux méthodes de détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Note, par Ecaterina Alexenco, Colette Georgesco et Luiza Soare 537
Le tampon véronal, moyen d'extraction des antigènes bactériens, Note de laboratoire, par Cella Barber 541
Immunisation antitétanique du nouveau-né par la vaccination pendant la grossesse. Etudes cliniques et expérimentales, par P. Condrea, Elena Poenaru, Mira Esrig et I. Filipesco 549
Contribution à l'étude de la pathogénite et de l'histopathologie de l'infection à *Leishmania donovani* chez le hamster doré *(Cricetus auratus)*, par Gh. Lupasco, Aspasia Agavriloaiei et Al. Gh. Ciplea 565
La variabilité du staphylocoque doré sous l'influence des polynucléaires du cobaye, par I. Mesrobeanu, Ştefania Ţaga, Ecaterina Alexenco et D. Stavri 579
Formations capsulaires chez les variantes des staphylocoques soumis à l'influence des leucocytes « in vivo », par I. Mesrobeanu et Ştefania Ţaga 591
Recherches sur le rôle de la radiation ionisante dans l'infection expérimentale avec des staphylocoques pathogènes, par N. Nestoresco, S. Benes et I. Strîmbeanu . 599
Le caractère de l'endémie palustre et l'efficience des méthodes d'éradication, appliquées dans une région endémique de la zone tropicale, par I. Spînu, M. Smolinski et Maria Atanasiu, en collaboration avec Le Van Uoc, Vu Phi Hung, Ho Van Huu, Do Duc Tuy et Simona Petresco 617

Le cycle des acides tricarboxyliques chez le *Mycobacterium tuberculosis* atténué (BCG) et chez ses variantes résistantes à la streptomycine, au PAS et à l'hydrazide de l'acide isonicotinique, par EUGENIA SORU, MARIA ISTRATI, JUDITH SZABADOS, D. TANASESCO, et MARIA PARASCHIVESCO 637
Sur les réactions sérologiques et allergiques dans les formes chroniques et latentes de brucellose, par MARIA ZALMAN, V. LUSTREA, DOINA GHERMAN, et S. LEVIN . . 651
Le vaccin associé diphtéro-tétano-pertussis. Note II. Réactions post-vaccinales et réponse immunologique chez les enfants vaccinés, par GH. CALALB, ELENA POENARU, N. POZSGI, ECATERINA STANICA, H. KRANZDORF, ALICE SARAGEA, PAULA MAXIMESCO, CECILIA STOIAN, MIRA ESRIG, M. LAZĂR, N. LAŞCO et VIORICA ANDREESCO-ŢIGOIU 667
Recherches expérimentales sur l'intoxication à l'oxycyanure de mercure, par C. BONCIU et MONICA PETROVICI 677
Influence de la température sur le développement de la toxigenèse du *Clostridium perfringens*. Zone optima de température des clostridies, par A. SĂSĂRMAN et THEA HORODNICEANU 691
Étude comparative de plusieurs méthodes pour l'obtention d'un sérum hémolytique à titre élevé, par C. ZILIŞTEANU et SOFIA LESCINSCHI 699
Sur l'incidence du *Clostridium perfringens* type « F » et type « A » thermorésistant, dans l'intestin des sujets sains, par THEA HORODNICEANU et A. SĂSĂRMAN 709
L'action de l'acide éthylène-diamino-tetra-acétique (EDTA) sur l'intoxication et l'infection expérimentale avec le *Clostridium perfringens* type « A », Note II. Le pouvoir préventif de Na_2 EDTA Ca contre l'intoxication expérimentale avec l'alphatoxine perfringens, par J. BITTNER, VIORICA VOINESCO et D. WINTER 717
Contribution expérimentales à l'étude de l'embryongenèse et de l'infectiosité des œufs d'*Ascaris lumbricoides* dans l'eau, par ANGELA SORESCO, et D. PANAITESCO . . 725
Contribution à l'étude de l'antibiose « in vitro » des souches locales de *Neisseria meningitidis* et d'autres *Neisseria*, par AURICA TOPCIU et ELVIRA POPESCO 733
Etude de l'antigénicité du vaccin antipoliomyélitique inactivé, sur un groupe d'enfants de Bucarest, par M. MARCOVICI, ELENA BUIMOVICI et AL. CALOMFIRESCO . . . 747
Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérocoques, isolés en différentes conditions pathologiques chez l'homme, par IRINA BELOIU, PAULA PLECEAS et ILEANA CAFFE 755
TABLE DES MATIÈRES 763
TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS 767

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

A

Agvriloaiei (Aspasia): 565
Alessandresco (D.): 393
Alesseanu (Gh.): 321
Alexandresco (N.): 1
Alexenco (Ecaterina): 381, 387, 393, 537, 579
Andreesco-Tigoiu (Viorica): 181, 431, 667
Andrian (T.): 77
Angelesco (I.): 171
Anghelesco (S.): 357
Antohi (Maria): 461
Antohi (S.): 63, 263
Atanasiu (Maria): 617

B

Băditoiu (I.): 77
Bădulesco (Elisabeta): 321, 375
Baldovin-Agapi (Coralia): 191, 219, 231, 479
Balş (M.): 365
Barber (Cella): 103, 201, 219, 231, 511, 541
Barbu (A.): 321
Beliş (V.): 43
Beloiu (Irina): 219, 231, 479, 755
Beneş (S.): 599
Berceanu (St.): 491
Bittner (J.): 63, 161, 263, 717
Bogdănesco (Viorica): 461
Bonciu (C.): 43, 171, 677
Bordeianu (P.): 321
Borşai (Leia): 191
Botez (Virginia): 171
Brinduş (Gh.): 503
Buimovici (Elena): 747

C

Caffé (Ileana): 219, 381, 479, 755
Calalb (Gh.): 95, 181, 667
Calomfiresco (A.): 321, 747
Cerbu (Al.): 21, 201, 425
Chelemen (N.): 77
Chiresco (Margareta): 191
Cioroianu (Natalia): 95
Ciplea (Al. Gh.): 337, 565
Ciufeco (C.): 87
Ciurea (C.): 129, 337
Combiesco (Ileana): 441
Condrea (P.): 161, 549
Corneci (I.): 77
Cristesco (Aurelia): 441

D

Dimitriu (Ofelia): 21, 201, 425
Do duc Tuy: 617
Dona (D.): 431
Dunăreanu (H.): 503
Duport (Maria): 441

E

Elian (M.): 33
Esrig (Mira): 161, 181, 549, 667
Eustatziou (G.): 461
Eustatziou (Silvia): 103, 461

F

Floresco (D.): 375
Filipesco (I.): 549

G

Georgesco (Colette): 381, 537
Gherman (Doina): 651
Ghioni (Elena): 393
Golăesco (Maria): 269
Goldis (E.): 517
Gorea (A.): 301, 313
Grigoriu (T.): 191, 321

H

Hacig (Alice): 337
Horodniceanu (F.): 115
Horodniceanu (Thea): 257, 471, 691, 709
Ho van Huu: 617

I

Ianco (Larissa): 129, 337
Iliesco (M.): 491
Ionesco (Al.): 43

Ionesco (Honorina): 1, 13
Ionesco (Maria): 321
Istrati (G.): 53, 87
Istrati (Maria): 637
Iuga (C.): 77
Ivasco (Alexandrina): 145

K

Klein (R.): 115
Kranzdorf (H.): 181, 667

L

Laşco (N.): 667
Lazăr (M.): 667
Leonesco (M.): 365
Lescinschi (Sofia): 145, 697
Le van Uoc: 617
Levin (S.): 651
Lupaşco (Gh.): 337, 441, 565
Lustrea (V.): 651

M

Marcovici (M.): 747
Marx (A.): 287
Maximesco (Paula): 95, 181 667
Meitert (Eugenia): 277, 461
Meitert (T.): 87, 277, 301, 313
Mesrobeanu (I.): 399, 579, 591
Mesrobeanu (Lydia): 399
Mihăilesco (Ana): 95
Mihalco (Florica): 191
Mitrică (Natalia): 13, 399
Moldovan (N.): 249, 517
Munteanu (Natalia): 191
Munteanu (P.): 1
Munţiu (N.): 77

N

Nestoresco (N.): 321, 375, 381, 393, 599
Nicolesco (Marcela): 523

O

Olinici (N.): 145

P

Panaitesco (D.): 129, 725
Panaitesco (G. E.): 191
Panaitesco (Gh.): 321
Paraschivesco (Maria): 171, 637
Perederi (S.): 1
Petresco (Simona): 617
Petrovici (Monica): 171, 677
Pleceaş (Paula): 479, 755
Podhorski-Costin (Eugenia): 529
Poenaru (Elena): 161, 181, 549, 667
Popa (Suzana): 95
Popesco (Ana): 95
Popesco (Elvira): 733
Popovici (Marcella): 375, 387. 393
Pozsgi (N.): 181, 431, 667

R

Racoviţă (D. C.): 375
Rădulesco (Elena): 491

S

Săndesco (Ionela): 441
Săndulesco (Maria): 441
Saragea (Alice): 95, 181, 667
Săsărman (A.): 215, 257, 471, 691, 709
Scurtu (Arety): 269
Sergiesco (Dina): 115
Sferdian (O.): 517
Smolinski (M.): 617
Soare (Irina): 269, 511
Soare (Luiza): 393, 537
Solomon (I.): 321
Solomon (Paula): 337
Soresco (Angela): 129, 725
Soresco (Maria): 295
Soru (Eugenia): 633
Spinu (I.): 617
Stamatin (N.): 357
Stănică (Ecaterina): 181, 295, 667
Stavri (D.): 137, 287, 579
Steresco (P.): 249, 517
Stoian (Cecilia): 181, 295, 667
Strimbeanu (I.): 599
Sturdza (Nina): 33
Szabados (I.): 637
Szegli (Lucia): 1, 381

T

Ţaga (M.): 491
Ţaga ((Ştefania): 575, 591
Tănăsesco (D.): 637
Teodoru (G.): 393
Thomas (Emilia): 375
Topciu (Aurica): 529, 733
Ţupa (Sanda): 381
Ţurcanu (Al.): 491

V

Vainer (Henriette): 491
Vasilesco (Th.): 21, 201, 425,
Vasiliu (Ecaterina): 321
Voiculesco (R.): 1
Voinesco (Viorica): 63, 263, 717
Vu phi Hung: 617

W

Weinbach (R.): 239, 249, 517
Winter (D.): 717

Z

Zalman (Maria): 651
Zarnea (G.): 1, 13
Zilisteanu (C.): 699